



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

---

# **Implicancias del gen *FMRI* en la función ovárica**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas**

**Lic. IANINA C. FERDER**

**Director de Tesis: Dra. Liliana B. Dain**

**Consejera de Estudios: Dra. Nora Ceballos**

**Instituto de Biología y Medicina Experimental**

**IBYME – CONICET**

---

**Buenos Aires, 2013**

*Dedicado a mamá y a papá*

*"If we are to have faith that mankind will survive and thrive on  
the face of the earth, we must believe that each succeeding  
generation will be wiser than its progenitors"*

Rosalyn Yalow, Premio Nobel de Medicina, 1977

Quiero agradecerle a todos aquellos que, de una forma u otra, hicieron posible la realización de este trabajo

*A mi directora de tesis, la Dra. Liliana Dain (Lili), por haberme recibido en su laboratorio cuando aun siendo estudiante me acerqué a ella para pedirle trabajo. Por formarme y enseñarme a pensar de manera crítica y analítica. Por su aporte intelectual y por guiarme durante el desarrollo, diseño y análisis de los experimentos. Por las charlas no solo profesionales, sino personales también, por su calidez y buen humor.*

*Al Dr. Eduardo Charreau, por recibirme en su laboratorio y por su apoyo para permitirme finalizar con los experimentos de esta tesis.*

*A Vicky, por formarme en mis inicios en el mundo de la ciencia. Por la paciencia y la disposición para ayudarme en lo que necesitara.*

*A Viole y Ana Rosa, por la compañía, cariño y apoyo durante los años en los que hemos compartido el 216. Por las charlas y todos los momentos compartidos en el trabajo diario.*

*A Fer Parborell, por su infinita ayuda con las ratas. Por discutir conmigo los resultados y transmitirme sus conocimientos. Por su calidez y paciencia.*

*A Dalhia, por enseñarme a trabajar con animales, por la paciencia cuando me temblaban las manos. Por los consejos y disposición para ayudarme siempre.*

*A Sully, por su ayuda en la discusión de los resultados, por estar siempre dispuesta a recibirme y enseñarme. Por su apoyo en esta última parte de mi carrera.*

*A Diana, por la colaboración técnica con los ensayos de RIA.*

*A Griselda y Nazareth, por su ayuda con el cultivo de células, sus consejos y generosidad.*

*A los chicos del 213, por los préstamos que me han salvado en reiteradas ocasiones, los consejos, los mates, las charlas y las risas. Por haber compartido el pasillo durante todos estos años.*

*A mis compañeros del Centro de Genética, Ceci, David, Meli, Lu y Noe, por su ayuda y apoyo en los comienzos y en la finalización de la tesis. Por las risas y buen humor.*

*Nuevamente a David*, por la infinita ayuda con las secuencias, por hacer de *delivery* entre el Centro y el IByME, por siempre estar dispuesto a ayudar.

*A los grupos de trabajo del IByME*, por los préstamos, consejos y ayuda.

*Al personal de la biblioteca, en especial Gaby*, por preocuparse por mi bienestar durante las mañanas y tardes que he pasado en la biblioteca. Por hacer de ella un espacio placentero y agradable. Por los cafés.

*A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA*, por brindarme una excelente educación y las bases y conocimientos para mi formación profesional.

*Al CONICET*, por el aporte económico que me permitió realizar la tesis.

*A Ceci Proietti*, por haber descubierto una persona sumamente valorable. Por los consejos profesionales y personales, por la ayuda, préstamos y recomendaciones. Por haber sido y seguir siendo parte de mi formación profesional. Por los almuerzos diarios, los momentos compartidos, los mates y las meriendas. Por haber estado siempre que la necesité.

*A mi familia, a mamá, papá y Lionel*, por su amor incondicional y su apoyo a lo largo de todo este camino. Por acompañarme y por estar orgullosos de mí y del camino que elegí. Por aguantar mis malhumores y enojos y a pesar de ellos permanecer a mi lado.

*Finalmente a Jon*, por su amor, paciencia y apoyo. Por acompañarme en las elecciones que tomé. Por la eterna paciencia, por aguantar los enojos y malhumores y seguir eligiéndome día a día. Por ser parte de mi vida. Por hacerme feliz.

Algunos resultados de esta tesis dieron origen a la siguiente publicación:

**“Expression of Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) and *Fmr1* mRNA during folliculogenesis in the rat”**

Ferder, I, Parborell, F, Sundblad, V, Chiauzzi, V, Gómez, K, Charreau, E, Tesone, M, Dain, L.  
Reproduction (2013); 145(4):335-43.

**INDICE**

RESUMEN.....	1
SUMMARY .....	5
INTRODUCCIÓN .....	9
1. OVARIO .....	9
1.1. Estructura y función .....	10
1.2. Foliculogénesis.....	12
1.3. Selección del folículo dominante .....	17
1.4. Ovulación .....	18
1.5. Luteinización.....	19
2. CICLO OVÁRICO.....	20
2.1. Ciclo ovárico de la rata .....	20
2.2. Ciclo ovárico del humano .....	22
2.3. Factores involucrados en el reclutamiento inicial y cíclico de la foliculogénesis .....	24
2.4. Regulación intraovárica del desarrollo folicular .....	25
2.5. Regulación endócrina del desarrollo folicular .....	27
2.6. Apoptosis.....	28
3. INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA (IOP).....	30
4. GEN <i>FMRI</i> (FRAGILE X MENTAL RETARDATION 1).....	32
4.1. FMRP (FRAGILE X MENTAL RETARDATION PROTEIN).....	37
4.2. INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA ASOCIADA A LA FRAGILIDAD DEL X (FXPOI).....	40
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS .....	48
Animales .....	48
Tratamientos realizados para la obtención de ovarios en distintos estadios del desarrollo folicular .....	49
Aislamiento de folículos .....	50
Cultivo de folículos .....	51
Radioinmunoensayo (RIA) .....	51
Inmunohistoquímica.....	52
Western blot .....	53
Extracción de ARN para la realización de la retrotranscripción y posterior PCR (RT-PCR) .....	55
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	56

Secuenciación.....	58
Estudios de transfección con vectores conteniendo diferente número de tripletes .....	59
<i>Amplificación de los plásmidos conteniendo distinto número de tripletes</i> .....	59
Cultivos celulares y transfecciones .....	61
Estimación del número de tripletes endógenos del gen <i>FMR1</i> en las células KGN .....	62
PCR en tiempo real (RT- qPCR).....	64
Análisis de datos .....	66
RESULTADOS .....	67
1. EXPRESIÓN DE FMRP DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR DE RATA.....	67
1.1. Análisis de la expresión de FMRP en los diferentes tipos celulares de ovario mediante inmuhistoquímica .....	68
1.2. Análisis de la expresión de FMRP en folículos en distintos estadios de la foliculogénesis mediante Western-blot .....	72
2. EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO DE <i>FMR1</i> DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR DE RATA .....	75
3. POSIBLE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>FMR1</i> EN FOLÍCULOS ANTRALES TEMPRANOS POR FSH .....	77
4. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE ISOFORMAS DE <i>FMR1</i> EN FOLÍCULOS AISLADOS Y OVARIOS DE RATA .....	79
4.1. Estudio por RT-PCR .....	79
4.2. Secuenciación de las bandas amplificadas .....	82
5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE UN VECTOR CONTENIENDO TRIPLETES EXPANDIDOS EN CÉLULAS EN CULTIVO .....	95
5.1. Detección de células que expresan GFP a distintos tiempos de transfección .....	97
5.2. Medición de los niveles de GFP en células KGN y HEK.....	101
5.3. Medición de los niveles de BCL-2 y BAX en células KGN.....	103
DISCUSIÓN .....	106
1. EXPRESIÓN DE FMRP DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR DE RATA.....	110
1.1. Análisis de la expresión de FMRP en los diferentes tipos celulares de ovario mediante inmuhistoquímica .....	110
1.2. Análisis de la expresión de FMRP en folículos en distintos estadios de la foliculogénesis mediante Western-blot .....	111
2. EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO DE <i>FMR1</i> DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR DE RATA .....	116



3. POSIBLE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>FMRI</i> EN FOLÍCULOS ANTRALES TEMPRANOS POR FSH .....	118
4. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE ISOFORMAS DE <i>FMRI</i> EN FOLÍCULOS AISLADOS Y OVARIOS DE RATA .....	119
5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE UN VECTOR CONTENIENDO TRIPLETES EXPANDIDOS EN CÉLULAS EN CULTIVO .....	124
5.1. Detección de células que expresan GFP a distintos tiempos de transfección .....	125
5.2. Medición de los niveles de GFP en células KGN y HEK .....	127
5.3. Medición de los niveles de BCL-2 y BAX en células KGN .....	131
CONCLUSIONES .....	134
BIBLIOGRAFÍA .....	137
APÉNDICE .....	164

## RESUMEN

El gen *FMRI*, responsable del Síndrome de Fragilidad del X (SFX), se localiza en el sitio FRAXA en el brazo largo del cromosoma X (Xq27.3), está compuesto por 17 exones, abarca aproximadamente 38 kilobases (kb) y su producto transcripcional es un ARN mensajero de 3,9 kb que puede sufrir *splicing* alternativo. En su región 5' no codificante presenta una zona de tripletes CGG que puede variar en longitud. Según el tamaño de la expansión, los alelos se clasifican en **normales** (5- 44 repeticiones), **intermedios** (45-54 repeticiones), **premutados** (55- 200 repeticiones) o con **mutación completa** (>200 repeticiones). Mientras que la mutación completa es la causante del SFX, el estado de premutación se asocia a otros 2 desórdenes clínicos: *Síndrome de temblor/ ataxia asociado a la Fragilidad del X (FXTAS)*, un desorden neurodegenerativo de inicio tardío y a la *Insuficiencia Ovárica Primaria (IOP) asociada a la Fragilidad del X (FXPOI)*.

La IOP se define como la presencia de amenorrea (de al menos 4 meses) antes de los 40 años, que se acompaña de un aumento en los niveles séricos de FSH (a niveles menopáusicos) y de bajos niveles de estradiol (hipoestrogenismo). Es un síndrome muy heterogéneo de patogénesis multicausal tales como alteraciones cromosómicas, enzimáticas, autoinmunidad, causas iatrogénicas e infecciosas. Tiene una incidencia del 1% en mujeres menores de 40 años y del 0,1% en menores de 30.

FXPOI es la causa genética conocida más común de la IOP 46, XX y la premutación en *FMRI* es responsable del 4- 6% de todos los casos de IOP 46, XX. Aproximadamente el 2% de las mujeres 46, XX con IOP aislada y el 14% de la mujeres 46, XX con IOP familiar son portadoras de la premutación en el gen *FMRI*. Asimismo, se ha descrito que alrededor del 20% de las mujeres portadoras de la premutación desarrollan IOP. A su vez, las mujeres portadoras se vuelven menopáusicas aproximadamente 5 años antes que las no portadoras. Si bien no todas las mujeres portadoras de la premutación experimentan una temprana pérdida de la fertilidad, todas ellas enfrentan el potencial adelantamiento en la aparición de condiciones asociadas con la deficiencia

estrogénica (aumento en el riesgo de osteoporosis y de enfermedades cardiovasculares). Estudios genéticos epidemiológicos sugieren que el comienzo y la gravedad de la disfunción ovárica asociada a FXPOI son variables y podrían estar moduladas, potencialmente, por el largo de las repeticiones CGG y otros factores ambientales.

El *status* de premutación *per se* pareciera estar influyendo en la expresión de la enfermedad. De hecho, no se ha descrito que mujeres que poseen expansión completa de tripletes (>200 repeticiones y con signos clínicos de Síndrome de Fragilidad del X) desarrollen IOP. Si bien no se conoce el mecanismo por el cual la premutación del gen *FMRI* puede causar la disfunción ovárica y la insuficiencia ovárica primaria, se ha postulado que puede ocurrir una disminución inicial del número de folículos o una velocidad acelerada de la atresia. Es sabido que la proteína que codifica este gen, FMRP, se expresa en altas cantidades en células germinales del ovario fetal. Asimismo, se ha descrito que esta proteína actúa como inhibidor de la traducción de algunos ARN mensajeros formando parte de los procesos de silenciamiento génicos mediados por miRNAs. Teniendo en cuenta su función, se ha postulado como posible hipótesis de la patogenia, que un aumento de FMRP en estadios tempranos del desarrollo de los ovocitos podría conducir a una haploinsuficiencia de proteínas involucradas en este proceso, provocando una disminución del *pool* inicial de folículos. Sin embargo, y dado que en FXTAS se ha observado un aumento del ARN mensajero del gen como consecuencia de la premutación, se postula como mecanismos alternativo la existencia de un aumento del ARN mensajero en el ovario que ejerza un efecto tóxico en el tiempo, con el consecuente incremento de la atresia folicular. Ninguno de estos mecanismos han sido aún comprobados en el ovario, más aún la función fisiológica de la proteína en el mismo no está establecida. No se conoce además, si existe expresión diferencial a lo largo del desarrollo folicular.

Considerando la escasa información que existe acerca de *FMRI* y su expresión en ovario, nuestro trabajo consistió, en una primera fase, en el estudio de la expresión de la proteína FMRP y su mensajero a lo largo de la foliculogénesis, en un modelo de rata.

Se utilizaron 3 grupos de ratas: ratas prepuberales de 18 días, ratas prepuberales de 21-23 días tratadas con dietilestilbestrol (DES) para enriquecer a los ovarios en folículos antrales tempranos y ratas prepuberales de 21-23 días tratadas con gonadotrofina coriónica equina (PMSG) para enriquecer los ovarios en folículos preovulatorios.

En la primera parte del trabajo analizamos, por inmunohistoquímica, la expresión de FMRP en los distintos tipos celulares del folículo. Hallamos que la proteína se expresa en células de la granulosa, de la teca y en células estromales, con excepción de un grupo de células que rodea al folículo. La expresión se detectó en los folículos en los tres estadios del desarrollo estudiados: preantrales, antrales tempranos y preovulatorios.

La expresión de la proteína FMRP fue estudiada también por Western blot en los tres tipos foliculares. Observamos una menor expresión en folículos preantrales y una mayor expresión en estadios más avanzados de la foliculogénesis. Por otra parte, se detectaron al menos 4 isoformas de la proteína cuyos patrones de expresión resultaron diferentes a los observados en testículo y cerebro. Teniendo en cuenta la función de la proteína como parte del complejo de silenciamiento post-transcripcional, estos resultados nos permitirían estimar que las diferencias observadas en los niveles de expresión de la proteína tendrían un rol en el correcto desarrollo del folículo. Asimismo, la presencia de isoformas distintivas en el ovario sugeriría una función específica para algunas de ellas en la gónada.

La segunda parte del trabajo consistió en el estudio de la expresión del ARN mensajero de *Fmr1* en los 3 estadios foliculares. Por PCR en tiempo real observamos que el patrón de expresión era opuesto al que se obtuvo para la proteína. En los folículos preovulatorios, el nivel del ARN fue menor respecto al de los estadios anteriores. Estos resultados sugerirían que la expresión del mensajero y su proteína en el ovario están regulados de manera diferente y posiblemente independiente. Por otro lado, identificamos por RT-PCR y posterior secuenciación, la existencia de varias isoformas del ARNm del gen, resultantes del *splicing* alternativo del mismo. Entre ellas, detectamos la isoforma que contiene al exón 12, la cual no ha sido previamente descripta en rata.

El último aspecto que quisimos abordar en nuestro estudio fue el efecto biológico de la introducción de tripletes en el rango de la premutación sobre una línea celular de células de granulosa humana (KGN). Par tal fin se transfectaron las células con un plásmido conteniendo tripletes en el rango normal o de la premutación, río arriba de un gen reportero (GFP). Luego de 18 horas de transfección, los niveles de ARNm del gen reportero resultaron más elevados en las células que poseían los tripletes en el rango de la premutación, en concordancia con lo observado en diferentes experimentos y pacientes con FXTAS. Asimismo, detectamos una menor cantidad de células que expresan la proteína GFP, en presencia del plásmido con la premutación, en todos los tiempos de transfección estudiados.

A nivel neuronal se ha relacionado al estado de premutación con posibles efectos apoptóticos en la célula. Si bien nuestros estudios aún no demuestran que el efecto de la introducción de tripletes en el rango de la premutación resulte en un aumento en la apoptosis de las células KGN, los resultados obtenidos en esta tesis abren la posibilidad de que este mecanismo sea analizado en un futuro.

En conclusión, en esta tesis se describe por primera vez la expresión de la proteína FMRP y de su mensajero a lo largo del desarrollo folicular, y la presencia de algunas isoformas distintivas, producto del *splicing* alternativo del gen. Asimismo, se iniciaron los estudios tendientes a demostrar el efecto patogénico que posee la expresión de tripletes expandidos en células del ovario.

**Palabras clave:** Gen *Fmr1*, foliculogénesis, ovario, Insuficiencia ovárica primaria, premutación.

## SUMMARY

### ROLE OF *FMRI* GENE IN OVARIAN FUNCTION

The *FMRI* gene, responsible for the Fragile X Syndrome (FXS), is located in the FRAXA site of chromosome X. The gene is composed of 17 exons, spans about 38 kb and encodes an messenger RNA (mRNA) of 3.9 kilobases (kb) that can be alternatively spliced into a number of different isoforms. The 5' UTR of the *FMRI* gene presents a CGG repeat that is unstable and therefore variable. Based on the size of the expansion, alleles are classified as normal (5–44 trinucleotide repeats), intermediate (45–54 repeats), premutated (55–200 repeats), or fully mutated (>200 repeats). While full mutation is the responsible for FXS, the premutation condition has been associated to other 2 clinical disorders: *Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)*, a neurodegenerative disorder of late onset and to the *Fragile X- associated primary ovarian insufficiency (FXPOI)*.

Primary ovarian insufficiency (POI) is defined as amenorrhea (for at least 4 months) before age of 40, an increase in serum levels of FSH (to menopausal levels) and low levels of estradiol (hypoestrogenism). This syndrome is very heterogeneous with a multicausal pathogenesis, and any of the following: chromosomal, enzymatic, iatrogenic, autoimmune or infectious aberration may be the cause of the disease. It has an incidence of 1% in women under age of 40 and of 0.1% below 30 years of age.

FXPOI is the most common known genetic cause for IOP and the premutation condition is responsible for 4-6% of all cases of 46, XX IOP. About 2% of women 46, XX with IOP and 14% of women 46, XX with familial IOP, carry the premutation in the *FMRI* gene. Moreover, it has also been described that around 20% of women carrying the premutation, become menopausal around 5 years earlier than not carriers. The premutation status seems to influence the expression of the disease. In fact, no full mutated women with IOP have been described.

While not all women carries of the permutation experience an early loss of fertility, all carriers face the potential advance in the onset of the conditions associated with estrogenic deficiency

(higher risk for osteoporosis and heart diseases). Epidemiologic genetic studies also suggest that the onset and severity of ovarian dysfunction associated to FXPOI is variable, and could be potentially modulated by the CGG repeat length and environmental factors.

Even though the underlying mechanism by which the *FMRI* premutation is responsible for the ovarian dysfunction and POI is not known, it has been suggested that an initial decrease of the number of follicles or an accelerated rate of atresia may take place.

The protein encoded by the *FMRI* gene, FMRP, is highly expressed in germ cells in the fetal ovary. The protein acts as a translation inhibitor of some target mRNA, most likely via the microRNA silencing complex. Given that in FXTAS an increase in *FMRI* mRNA has been observed, another possible mechanism for FXPOI is that high levels of mRNA exert a toxic effect causing an increase in follicular atresia.

None of the postulated pathogenic mechanisms has been demonstrated in the ovary. Moreover, the physiological role of FMRP in the gonad has not been established, and the expression pattern of the protein during follicular growth remains unknown.

Considering that there is limited information related to *FMRI* expression and function in the ovary, the goal of our work was, initially, to study the expression of FMRP protein and its messenger during folliculogenesis in a rat model.

For this propose, three groups of rats were used: 1- prepubertal rats of 18 days, 2- prepubertal rats of 21-23 days treated with Diethylstilbestrol (DES) to enrich ovaries with early antral follicles and 3- prepubertal rats of 21-23 days treated with equine chorionic gonadotropin (PMSG) to enrich ovaries with preovulatory follicles.

The expression of FMRP in the rat ovarian follicular cells was analyzed by immunohistochemistry (IHQ) and Western blot (WB). By IHQ we found that the protein is expressed in granulosa, theca and stromal cells, except in a group of cells surrounding the follicle, mainly in the cytoplasm. Expression was detected in follicles at all stages of folliculogenesis: preantral, early antral and preovulatory. After WB assays, lower expression in preantral follicle

was detected, whereas higher levels of FMRP were observed in later stages of folliculogenesis. Moreover, at least 4 isoforms of the protein were detected whose expression pattern differed from that observed in testis and brain. Considering FMRP's function as part of the post-transcriptional silencing complex, these results may suggest that the differences observed at FMRP expression levels, could exert a role in the proper development of the follicle. Furthermore, the presence of distinctive isoforms in the ovary could imply a specific function for some of them in the gonad.

In the second part of the work we studied the messenger RNA (mRNA) expression of *Fmr1* in the three follicular development stages. Using quantitative RT-PCR (qRT-PCR) we found that the mRNA expression pattern was opposite to that observed for the protein: in preovulatory follicles, mRNA level was lower compared to earlier stages. These results suggest that mRNA and protein expression in the ovary may be regulated at different and perhaps independent levels. In addition, by RT-PCR and subsequent sequencing, we identified several messenger isoforms resulting from alternative splicing. Among them, we detected the variant including exon 12, which has not been previously described in other rat tissues so far analyzed.

The last aspect we addressed in our work was the biological effect that the CGG repeats in the premutation range could exert on a human ovarian granulosa cell line (KGN). Cells were transfected with a plasmid containing repeats in the normal or in the premutation range cloned upstream of the GFP reporter gene. After different times of transfection, mRNA of the reporter gene was measured by qRT-PCR. We found that after 18 hours, the levels of mRNA was higher in cells transfected with the repeats in the premutation range comparing to the levels found for those with the normal one. These results are in agreement with the observations reported for FXTAS patients and for animal models of the syndrome. Moreover, when cells were transfected with the permuted plasmid, we detected fewer cells expressing the GFP protein in all the transfection times assayed.

In neurons, the premutation state has been associated with possible apoptotic effects in the cell. Even though our preliminary studies do not yet show that transfection of KGN cells with the



premutation plasmid results in increased apoptosis, the results obtained in the present work open the possibility for this mechanism to be analyzed in a future.

In conclusion, this work describes, for the first time, the expression of the FMRP protein and its messenger during folliculogenesis in a rat model. Moreover, the presence of some distinctive isoforms resulting from the alternative splicing of the gene in the ovary is also described. Although we found an increase in mRNA levels and reduced protein expression of the reporter gene containing permuted repeats, further studies are needed to elucidate the pathogenic mechanism of the expanded triplets in the ovary.

**Key words:** *Fmr1* gene, folliculogenesis, ovary, Primary ovarian insufficiency, permutation.

# INTRODUCCIÓN

## 1. OVARIO

### 1.1. Estructura y función

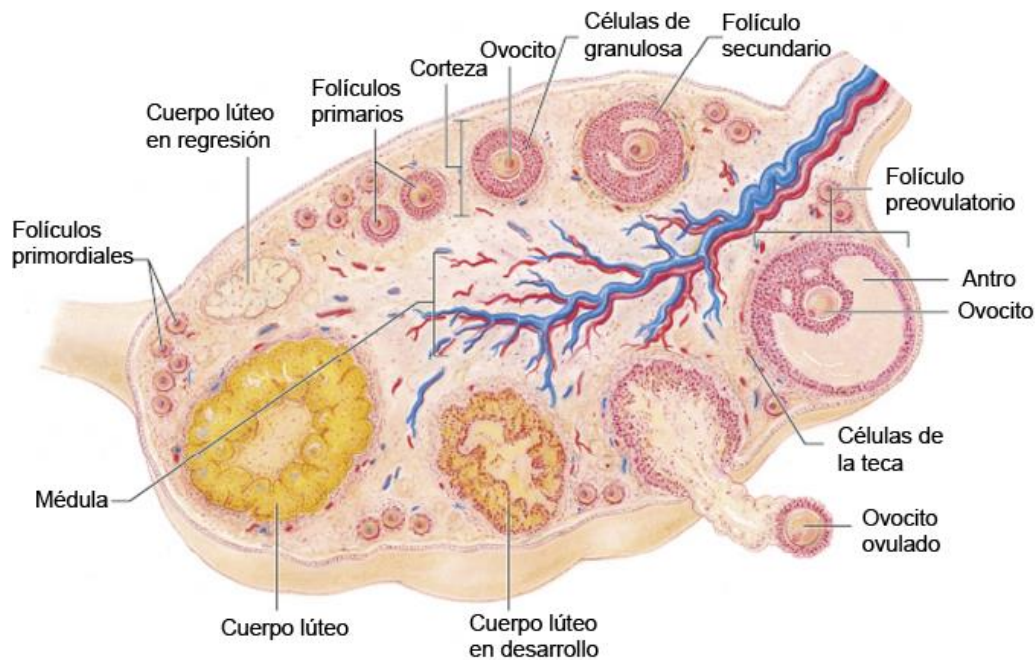
El ovario está constituido por un tejido en constante transformación. Posee una estructura multicompartimental caracterizada por propiedades biológicas diferentes y dinámicas. En los mamíferos, el ovario es el sitio de almacenamiento y desarrollo de la célula germinal femenina, el ovocito, que se forma durante la vida embrionaria/fetal o alrededor del momento del nacimiento. La principal función de la gónada femenina es la maduración del ovocito para la fertilización y exitosa propagación de la especie (McGee & Hsueh 2000). Para esto, genera un ambiente propicio para la instalación del cigoto, ligado a cambios inducidos por la transformación del folículo ovulatorio en cuerpo lúteo (Thibault *et al.* 1993, Knobil & Neill 1994, Fernandez *et al.* 2013). Además, el ovario constituye el órgano principal que contiene a las células secretoras de las hormonas esteroideas femeninas, estrógenos y progesterona, que desarrollan y mantienen los caracteres sexuales secundarios de la hembra, así como también las condiciones adecuadas durante la preñez.

Durante la adultez, la superficie del ovario es nodular y se encuentra cubierta por una capa monoestratificada de células cúbicas o poliédricas llamada epitelio germinal (Maekawa 1990). Ésta cubierta epitelial está, con mucha frecuencia, invaginada hacia el tejido conectivo subyacente llamado túnica albugínea, formando pequeños pliegues, hoyos o criptas. Por debajo se encuentran dos zonas: las llamadas zona cortical y zona medular, si bien el límite entre ambas no se encuentra bien definido. La primera comprende al estroma ovárico, formado por tejido conectivo laxo, fibroblastos y precursores de células tecales, folículos en distintos estadios de maduración, folículos atrésicos y cuerpos lúteos. La zona medular, por su parte, es una zona que se encuentra muy vascularizada e inervada y contiene células de tipo muscular y tejido conectivo laxo (Bloom & Fawcett 1997).

El ovario de mamíferos es, por lo tanto, un órgano heterogéneo en cuanto a la población celular presente en un momento dado y también lo es en el tiempo, a lo largo de la vida del individuo. Es

así, que a partir de la pubertad se producen variaciones hormonales cíclicas que afectarán tanto al ovario como al útero, preparándolos para la expulsión del ovocito y la potencial implantación del blastocisto.

En la *figura 1* se muestra un esquema de la estructura del ovario. El folículo ovárico constituye la unidad funcional fundamental del ovario. Su función es la de proveer el sistema de soporte necesario para que el ovocito adquiera la capacidad de unirse a una célula germinal masculina, el espermatozoide, con el fin de producir un embrión. Las células somáticas del folículo sintetizan hormonas sexuales femeninas que contribuyen a la regulación del ciclo sexual femenino.



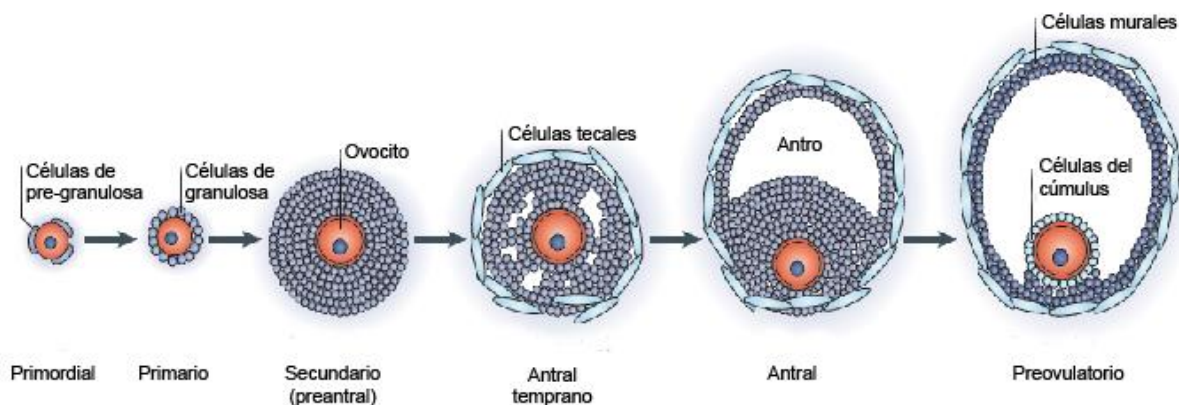
**Figura 1. Estructura del ovario y desarrollo folicular.** Adaptado de Addison Wesley Longman, Inc.

Las células somáticas proveen, por otro lado, los requerimientos nutritivos para el crecimiento del ovocito. Controlan la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos de folículos seleccionados para la ovulación y contribuyen a la atresia de los ovocitos de los folículos no seleccionados. Estos efectos directos de las células foliculares sobre el desarrollo y destino de los ovocitos que circundan, son mediados por cambios que se producen en el microambiente

folicular, principalmente a través de hormonas y factores de crecimiento que secretan las células foliculares hacia el fluido folicular que rodea al ovocito

## 1.2. Foliculogénesis

El proceso de *foliculogénesis* comprende el crecimiento del folículo y su pasaje a través de los distintos estadios de desarrollo, desde el momento en que emerge del pool de folículos formado durante la ovogénesis, hasta el momento en el cual es ovulado o entra en atresia (regresión o muerte del folículo). Este proceso es llevado a cabo en la corteza del ovario (*Figuras 1 y 2*).



**Figura 2. Estadios del desarrollo folicular.** Modificado de (Li & Albertini 2013).

Debido al continuo crecimiento y a la regresión de los folículos, la relación volumen /contenido del ovario se encuentra en constante cambio. Por otro lado, es sabido que para cada especie el número de folículos formados durante la ovogénesis es diferente. Es así que al nacimiento el ovario contiene alrededor de 20.000 folículos en las ratas, 16.0000 en ovejas, y 2.000.000 en humanos (Thibault *et al.* 1993). Hasta hace pocos años, se postulaba que el número total de folículos ováricos era determinado en forma temprana en la vida del individuo y que la depleción de este pool llevaba a la senescencia de la vida reproductiva (McGee & Hsueh 2000). Sin embargo, esta doctrina que sostenía que los mamíferos perdían su capacidad de generar células germinales durante su vida adulta, se encuentra hoy en día en amplio debate. Varios grupos

demostraron la presencia de células germinales mitóticamente activas en ovarios de ratones jóvenes y adultos, como así también en ovarios de mujeres, lo que sugiere la presencia de células germinales capaces de proliferar en el ovario del mamífero en períodos postnatales (Woods *et al.* 2013).

En los mamíferos, previo al nacimiento, las ovogonias son transformadas en **ovocitos primarios**. Esta transición de ovogonia a ovocito está determinada por el cese del proceso mitótico que sufren las células primordiales germinales y la entrada en la profase meiótica, en la cual los ovocitos quedan arrestados. Luego de este proceso, los ovocitos se rodean de una capa única de células foliculares aplanadas llamadas pregranulosa. En esta fase, la superficie del ovocito y de las células foliculares envoltantes es lisa y están en estrecho contacto. Las células foliculares se encuentran envueltas en la llamada lámina basal que separa a este tipo celular de todo elemento que la rodea, entre ellos, vasos sanguíneos, capilares y nervios (Irving-Rodgers & Rodgers 2000). Estos **folículos primordiales** se encuentran principalmente en la periferia de la corteza, inmediatamente debajo de la túnica albugínea y constituyen la reserva de folículos en reposo, que progresivamente se desarrollarán o eliminarán durante la vida reproductiva.

El proceso por el cual se produce el reclutamiento de folículos primordiales para que inicien su crecimiento, no se conoce en detalle. Sin embargo, se han identificado varios factores de transcripción que podrían estar regulando este paso de la foliculogénesis, como ser NOBOX, SOHLH-1/2, LHX8 y FOXL2. Además, existen diferentes factores que actúan de manera endócrina o parácrina para regular el reclutamiento de los folículos primordiales. Entre ellos se encuentran las neurotrofinas, citoquinas y factores de crecimiento como KGF, bFGF y factores de la familia de BMP (Monget *et al.* 2012).

Los folículos primordiales abandonan continuamente el reservorio para convertirse en **folículos primarios** (Figura 2). Esta transición implica ciertas modificaciones citológicas en el ovocito, en las células foliculares y en el tejido conjuntivo adyacente. A medida que el ovocito aumenta de tamaño, la capa única de células aplanadas se convierte inicialmente en una capa de células

cúbicas y cilíndricas que por mitosis originan las *células granulosas*. Entre el ovocito y las células granulosas circundantes se originan espacios donde se depositan mucopolisacáridos secretados por las células de la granulosa, sustancia que representa el inicio de la *zona pelúcida*, que más tarde originará un halo translúcido que rodea al ovocito. La zona pelúcida está formada por tres glicoproteínas y su presencia es una característica del folículo primario. Es sabido que ratones *knock out* para proteínas que componen la zona pelúcida son infértiles o subfértiles (Elvin & Matzuk 1998).

A medida que los folículos aumentan de tamaño, se van desplazando gradualmente hacia el interior de la corteza. A través de sucesivas divisiones mitóticas de las células de granulosa, el folículo primario unilaminar pasa a un estadio preantral, multilaminado (con dos o más capas de células de la granulosa rodeando al ovocito), denominado *folículo secundario o folículo preantral* (Figura 2). Estos folículos poseen una o dos arteriolas que terminan en una red vascular fuera de la lámina basal y por lo tanto el folículo entra en contacto directo con factores que se encuentran en circulación (Hirshfield 1991). En este estadio, las células de la granulosa conforman una población homogénea y adquieren receptores de alta afinidad para la hormona folículo estimulante (FSH), la principal hormona responsable del crecimiento folicular, y para hormonas esteroideas como el estradiol (Adashi *et al.* 1993). Además, existen otros factores esenciales para este proceso. Entre ellos se encuentran el factor de crecimiento insulínico (IGF), secretado por las células de granulosa, así como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y las interleukinas 1 $\beta$  y la 6 (Matsuda *et al.* 2012). Otro factor que regula el desarrollo folicular durante la transición del estadio preantral a antral temprano es el GDF-9 (Factor Diferenciador del Crecimiento-9), derivado del ovocito (Orisaka *et al.* 2006).

Simultáneamente con la proliferación de estas células, se desarrolla alrededor del folículo otra capa de células originadas del estroma que forman la *teca folicular*. La capa tecal se diferencia en una interna y otra externa, ésta última compuesta principalmente por tejido conectivo. La

aparición del estrato tecal se asocia con la adquisición de la vascularización del folículo. A medida que se forman los capilares, las células tecales parecen comenzar la diferenciación con la adquisición de los receptores de LH (Hormona Luteinizante) y la capacidad de biosíntesis de esteroides.

En este estadio, numerosos vasos pequeños penetran en la teca externa para proporcionar un rico plexo capilar a la teca interna y, dado que los capilares no penetran la membrana basal que separa a la teca de las células de la granulosa, la capa de granulosa permanece avascular durante todo el crecimiento del folículo. Como consecuencia de este aumento de la vascularidad, el folículo aumenta su exposición a factores circulantes en la sangre (Geva & Jaffe 2004). Actualmente se conoce que el factor VEGF (Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular) es un importante mitogéno de las células del endotelio vascular y sería uno de los principales factores involucrados en la angiogénesis del folículo (Leung *et al.* 1989). Su expresión aumenta conforme el folículo ovárico avanza en su desarrollo (Fraser 2006).

Al aumentar el folículo de tamaño, se termina de formar la zona pelúcida. Las células de la granulosa mantienen contacto con el ovocito a través de proyecciones citoplasmáticas que penetran en la zona pelúcida y establecen contacto con la membrana celular del ovocito. Al final de esta fase denominada ***preantral***, el ovocito detiene su crecimiento y se vuelve competente para reasumir la meiosis. Cuando el folículo alcanza un diámetro aproximado de 0,2 mm (en rata) y posee varias capas de células de granulosa, aparecen unos espacios irregulares, llenos de un líquido claro, entre las células. Este líquido aumenta en cantidad a medida que crece el folículo y los espacios irregulares que se forman entre las células de la granulosa confluyen para constituir una sola cavidad denominada *antro*.

Con la aparición de la *cavidad antral*, el folículo se convierte en folículo ***terciario o folículo antral*** (Figura 2) y esta fase se denomina ***fase antral***. Se forma, entonces, una cavidad central: el *antro folicular*, rodeado de *células de la granulosa murales* localizadas en la periferia. El folículo antral está tapizado por un epitelio estratificado de células de granulosa que presentan un



engrosamiento localizado en uno de sus lados, llamadas *células del cúmulus*, que mantienen una relación muy cercana con el ovocito mediante uniones estrechas (“gap-junction”) (*Figura 2*), y que se vuelve más laxa a medida que, de forma gradual, el líquido folicular llena los espacios intercelulares. Al desprenderse el ovocito, una o más capas de las células del *cúmulus*, permanecen unidas a él, formando la *corona radiata*, envoltura celular laxa que persiste alrededor del ovocito aún después de la ovulación.

La síntesis ovárica de las hormonas esteroideas- progesterona y estrógenos, así como los precursores androgénicos - se encuentra compartimentalizada en cada folículo. Como respuesta a la FSH, las células de la granulosa sintetizan progesterona que difunde hacia las células tecaes que carecen de receptores para FSH. Esta hormona sirve de sustrato para la síntesis de andrógenos en las células tecaes, bajo el control de LH. Los andrógenos difunden de regreso hacia las células de la granulosa donde son aromatizados a estrógenos por medio de la CYP19 y bajo el control de la FSH. La capacidad de estos dos tipos celulares de producir cada uno un tipo diferente de hormona esteroidea, llevó a formular la teoría de “dos células dos gonadotrofinas” para la regulación de la esteroidogénesis en el ovario (Fortune & Armstrong 1977, Tesone *et al.* 2009).

Durante la transición del folículo antral a folículo preovulatorio, y como consecuencia de la estimulación de FSH, se expresan los receptores de LH en las células de granulosa (McGee & Hsueh 2000). Este paso es fundamental para que el folículo progrese hacia el paso final, la *ovulación*. Asimismo, la expresión de la enzima aromatasa (CYP19) por parte de las células de la granulosa, permite que éstas conviertan los andrógenos tecaes en estrógenos, por lo cual la capacidad temprana de un folículo de secretar estrógenos, sería un indicador de que este folículo comienza a entrar en la etapa de folículo preovulatorio.

Los ***folículos preovulatorios*** (*Figura 2*) son aquellos que han alcanzado los estadios finales de crecimiento y maduración del folículo antral y han adquirido la habilidad para ovular frente a los niveles adecuados de gonadotrofina LH. Es de destacar que los receptores de LH no se expresan de forma homogénea en estos folículos, sino que presentan un gradiente de expresión que

disminuye desde las capas externas de la granulosa hacia las células del *cúmulus* (Amsterdam *et al.* 1975, Oxberry & Greenwald 1982). El caso más extremo es el de las células del *cúmulus* de ratón, en las cuales los receptores de LH son indetectables (Eppig 1979). Por esta razón, el reinicio de la meiosis inducida por LH y la expansión de las células del *cúmulus* requeridas para la ovulación, serían eventos mediados por las células de la granulosa murales (Phillips & Dekel 1982, Dekel *et al.* 1988). Además, estos folículos se caracterizan por una baja tasa mitótica de las células foliculares y una alta relación estrógenos/andrógenos y estrógenos/progesterona en el fluido folicular. En los folículos atrésicos, por otro lado, se pierde la capacidad de transformar los andrógenos en estrógenos por parte de las células de la granulosa y esta relación se encuentra invertida.

Desde el momento en que el folículo fue seleccionado para la ovulación comienza a crecer notablemente de tamaño. Las células de la granulosa sufren transformaciones morfológicas como ser el aumento de su volumen (Kumar *et al.* 1997). A este folículo destinado a ovular, se lo denomina *folículo dominante* (Gougeon & Testart 1986).

### 1.3. Selección del folículo dominante

Los estrógenos constituyen los principales factores responsables de establecer la dominancia de un folículo en maduración que será ovulado. Los otros folículos que no alcanzarán el proceso de ovulación, serán eliminados por el mecanismo de atresia. Una de las razones por las cuales los estrógenos son responsables de esta selección, es el hecho de ser moduladores de la secreción de gonadotrofinas a través del mecanismo de retroalimentación negativa. Como hemos mencionado anteriormente, el proceso de foliculogénesis es un proceso asincrónico, debido al continuo abandono de los folículos del estadio primordial para continuar su proceso de desarrollo. Por esta razón, dentro del ovario podemos encontrar una distribución de folículos antrales tempranos en distintos estadios madurativos, bajo la influencia de la FSH. A su vez, el factor IGF-I (Insulin-like growth factor-I) actúa sinérgicamente con las gonadotrofinas, estimulando la síntesis de estradiol,

de progesterona y la expresión de receptores LH. Este efecto sinérgico sugiere que IGF-I juega un papel importante en la selección de los folículos preovulatorios (Tesone *et al.* 2009).

El folículo preantral, que se convertirá en folículo dominante, parece ser el que se encuentra en un estadio madurativo más avanzado respecto de los otros folículos y/o aquel que tiene mayor acceso o sensibilidad a la FSH cuando los niveles de esta hormona comienzan a aumentar al final del ciclo menstrual previo.

#### 1.4. Ovulación

A medida que el folículo dominante progresa, hay un ascenso notable de estrógenos por sobre el umbral mínimo de la hormona, que estimula, por un mecanismo de retroalimentación positiva, un pico de gonadotrofinas, principalmente de LH y en menor medida de FSH. Junto con otros factores involucrados en el microambiente folicular, el pico de LH es el gatillo para que el folículo dominante ovule y origine un cuerpo lúteo. En humanos se produce en general la ovulación de un sólo folículo dominante, mientras que en roedores y otros mamíferos pueden haber más de uno (McGee & Hsueh 2000).

Luego del pico preovulatorio de LH, la síntesis de estradiol declina considerablemente, mientras que se produce un aumento notable en la producción de progesterona estimulada por la misma LH (Knobil & Neill 1994). Debido a la desaparición de las uniones estrechas, las células de la granulosa cercanas a la lámina basal comienzan a desprenderse, a excepción de aquellas células que forman parte de la *corona radiata*, el único sitio donde estas uniones no se ven alteradas.

En este proceso influye también un componente mecánico que se genera por el rápido aumento del tamaño folicular y la digestión proteolítica de la pared folicular. Es sabido que durante el proceso de la ovulación se activan colagenasas necesarias para la disolución de la membrana basal y el tejido tecal asociado del folículo. Las prostaglandinas de la serie E y F (PGE y PGF<sub>2α</sub>) son algunos de los componentes involucrados en la degradación de la pared folicular (Caron *et al.* 1975).

Luego de la ovulación, el folículo ovárico se transforma en cuerpo lúteo. Por su parte, el ovocito, que estaba detenido en profase I, reanuda la meiosis y queda detenido en el estadio de metafase II.

### 1.5. Luteinización

El cuerpo lúteo es un órgano endócrino transitorio formado por las células foliculares remanentes del folículo que fue ovulado. Su principal función es la de secretar progesterona, la cual tiene numerosas funciones, entre ellas, la preparación del útero para el período de preñez o embarazo y la regulación de las contracciones del oviducto para el transporte del óvulo al útero. Por lo tanto, la formación del cuerpo lúteo en mamíferos se considera un evento esencial para la supervivencia e implantación del embrión. Este proceso se inicia mediante numerosos cambios bioquímicos y morfológicos que sufren las células de la teca interna y las células de la granulosa de los folículos preovulatorios. Estos cambios que determinan el proceso de ***luteinización***, se producen como consecuencia del incremento en los niveles séricos de LH, asociado al pico preovulatorio de la hormona.

Las células del cuerpo lúteo derivan de los dos tipos de células foliculares secretoras de esteroides, la granulosa y la teca. Por lo tanto, esta glándula consiste en al menos dos tipos de *células luteales* que en primates se denominan *células granulosa- luteínicas* y *células teca- luteínicas* (en roedores se las denomina *grandes* y *pequeñas*). Las primeras derivan de la granulosa y contienen todos los elementos de las células secretoras de esteroides como ser numerosas mitocondrias y abundante retículo endoplasmático liso. Por el contrario, las células teca-luteínicas o pequeñas, provienen de la teca y tienen una cantidad moderada de mitocondrias pero abundante retículo endoplasmático liso. Ambos tipos celulares constituyen el 50 % del cuerpo lúteo, ya que éste contiene, además, abundantes elementos del tejido conectivo.

No todas las células se diferencian sincrónicamente luego de la ovulación. El establecimiento de un cuerpo lúteo funcional en los días siguientes a la ovulación, implica cambios morfológicos

como los que ya hemos descrito, además de una rápida vascularización de las capas celulares que se originan de la granulosa y de la teca. Es probable que este fenómeno de vascularización esté inducido por la ruptura de la membrana basal que separa a los dos tipos celulares.

El control de la secreción de progesterona en roedores es llevado a cabo por las hormonas LH, la prolactina (ambas luteotróficas) y la sustancia luteolítica prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ). En la mujer, la principal hormona reguladora del cuerpo lúteo, es la LH (y la hCG durante el embarazo). En ausencia de embarazo o preñez al final de cada ciclo ovárico, o cuando ya no es requerido para el mantenimiento de la placenta, el cuerpo lúteo deja de producir progesterona y regresa en un proceso denominado *luteólisis*. Se demostró que la muerte celular programada o apoptosis está asociada a este proceso (Carambula *et al.* 2002, Stocco *et al.* 2007).

## 2. CICLO OVÁRICO

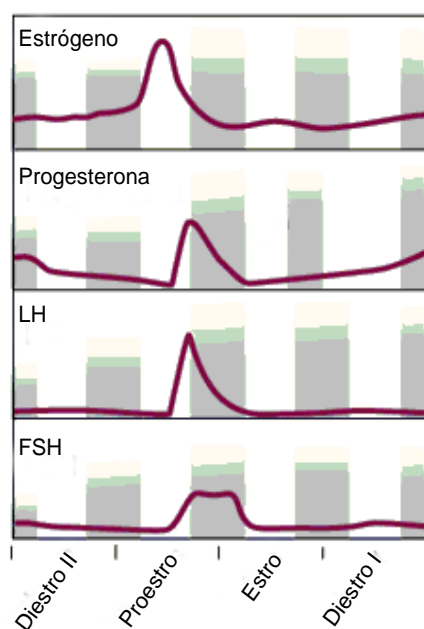
### 2.1. Ciclo ovárico de la rata

La maduración folicular que culmina cuando un folículo es ovulado y se forma el cuerpo lúteo, es un proceso cíclico que se repite a lo largo de la vida fértil de las hembras. Los diferentes estadios de este ciclo varían entre especies, pero en líneas generales se distinguen diferentes períodos en los que se producen variaciones en la secreción de hormonas hipofisarias, variaciones en la síntesis de hormonas esteroideas y la ovulación.

La *figura 3* resume el ciclo ovárico de la rata. El término **estro** fue utilizado por primera vez por Heape en el año 1900 (Heape 1900) para describir el período durante el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho en coito fecundante. Al período anterior al estro, lo denominó **proestro** y se caracteriza por ser el momento en el cual el animal entra en celo. En ausencia de concepción, el estro es seguido por el **metaestro**, también conocido como **diestro I**. El período siguiente, **diestro II**, es el tiempo durante el cual la secreción ovárica prepara a los tejidos reproductivos para la recepción del óvulo fertilizado luego del coito durante el estro. Este período es variable en duración de acuerdo a las especies, y en la rata dura uno o dos días, determinando

un ciclo estral con una duración de 4 o 5 días. Si la fertilización no ocurre, el animal vuelve al período de proestro y un nuevo ciclo se inicia.

La rata de laboratorio es un mamífero no estacional, de ovulación espontánea y poliéstrico. Es decir, el ciclo ovárico ocurre durante todo el año y la ovulación no depende del estímulo de la cópula. Debido a estas características, sumadas a su fácil reproducción y mantenimiento en el bioterio, podemos afirmar que la rata de laboratorio representa un buen modelo para el estudio de la fisiología ovárica gonadal.

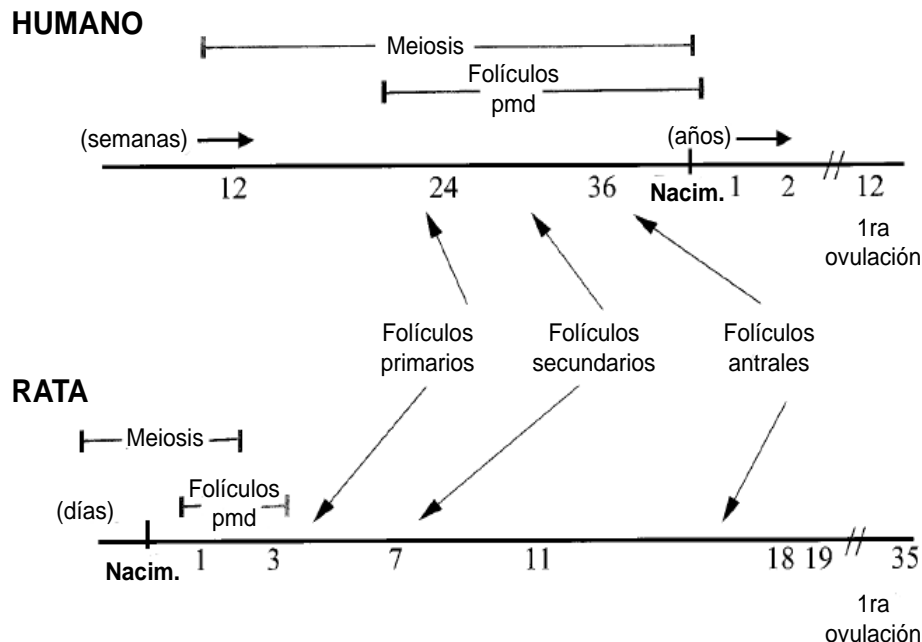


**Figura 3. Fluctuaciones en los niveles de estrógeno, progesterona, LH y FSH a lo largo de los 4 días del ciclo estral de la rata.** Las barras grises indican períodos de oscuridad (18:00 a 6:00). Modificado de (Staley & Scharfman 2005).

### 2.1.1. Cronología de la foliculogénesis en la rata

Los folículos primordiales se forman al tercer día de edad postnatal y el primer grupo que llegará al estadio antral lo hará a partir de la tercera semana de edad. Ya en el séptimo día a partir del nacimiento se pueden encontrar folículos secundarios bien desarrollados. La pubertad o primer “estro”, período en el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho, ocurre alrededor del día 34 luego del nacimiento y continúa regularmente hasta aproximadamente 10-12 meses de edad, momento en el cual los animales entran en ciclos irregulares. El tiempo que lleva el desarrollo de los folículos primordiales hasta folículos preovulatorios es un período de al menos sesenta días

(comenzando desde la etapa prenatal). Dentro de este período se necesitan más de 30 días para que los folículos primordiales se desarrollen en folículos secundarios e igual tiempo tarda el desarrollo de los folículos secundarios hasta el estadio en el cual serán ovulados (*Figura 4*).

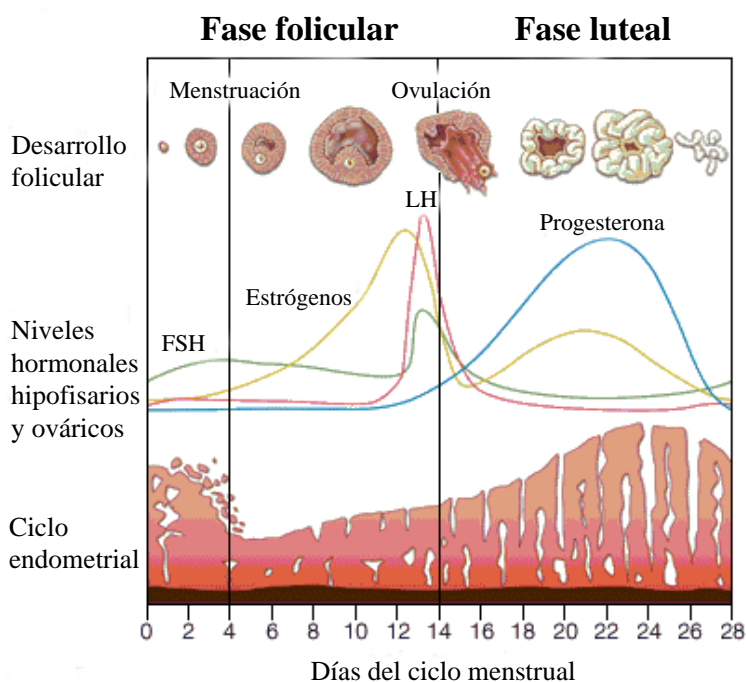


**Figura 4. Desarrollo folicular durante la vida fetal y neonatal en roedores y humanos.** pmd: primordiales; Nacim.: nacimiento. Modificado de Hsueh AJ et al. (McGee & Hsueh 2000).

## 2.2. Ciclo ovárico del humano

El ciclo menstrual es el período entre dos ovulaciones y es el resultado de un complejo sistema de retroalimentación en el que intervienen las hormonas esteroideas sexuales estrógenos y progesterona, gonadotrofinas hipofisarias, la hormona hipotalámica liberadora de gonadotrofinas (GnRH), y otros factores reguladores endócrinos y parácrinos intraováricos. Los estrógenos ováricos pueden ejercer tanto un control negativo como positivo sobre la secreción de FSH y LH, dependiendo de su concentración y de la duración del estímulo. Así, niveles moderados de estradiol ejercen una inhibición de la secreción de FSH y LH, mientras que un incremento agudo de estradiol, en forma de pico elevado, acompañado de un pequeño aumento de progesterona, revierte el efecto estimulando la secreción de gonadotrofinas.

En el humano, el ciclo menstrual tiene una duración de aproximadamente 28 días (rango 25-35 días). Por convención, el primer día de la menstruación se considera el día 1 del ciclo. Luego se continúa la fase folicular o proliferativa, en la cual ocurre la proliferación del endometrio preparándolo para la posible implantación de un óvulo fecundado, y alrededor del día 14 se produce la ovulación. A ésta le sigue la fase lútea o secretoria que dura alrededor de 14 días, durante la cual el folículo dominante se reorganiza para convertirse en el cuerpo lúteo. De no producirse la fertilización, el endometrio se desprende en la menstruación, iniciando un nuevo ciclo. En la *figura 5* se representan los cambios producidos en el ovario, en el endometrio y en los niveles hormonales a lo largo del ciclo menstrual.



**Figura 5. Cambios producidos en el ovario, en el endometrio y en los niveles hormonales a lo largo del ciclo menstrual.** Modificado de la Enciclopedia Británica.

### 2.2.1. Cronología de la foliculogénesis en humanos

El desarrollo folicular en humanos comienza con la transformación de las ovogonias en ovocitos primarios y con la entrada de los mismos en los primeros estadios de la meiosis, alrededor de la semana 11-12 de gestación. En la semana 20, el número total de células germinales llega a su pico máximo (6 a 7 millones), pero luego la tasa de división comienza a declinar. Los folículos



primordiales comienzan a formarse en la mitad de la gestación, cuando son rodeados por una única capa de células de la pregranulosa y así continúan hasta el nacimiento, momento en el cual el número de ovocitos es de 2 millones aproximadamente. Los eventos que se suceden durante el desarrollo del ovario en humanos son similares a los que ocurren en ratas, aunque los tiempos se encuentran mucho más comprimidos en roedores (McGee & Hsueh 2000) (*Figura 4*).

### 2.3. Factores involucrados en el reclutamiento inicial y cíclico de la foliculogénesis

Uno de los puntos más difíciles de dilucidar en la fisiología del ovario es el de los factores que determinan que los folículos permanezcan senescentes, entren en desarrollo y en proceso de atresia (muerte folicular), mientras que un tercer grupo madure y sea ovulado.

Para entender estos fenómenos, es importante destacar que existen dos eventos importantes durante la foliculogénesis: el ***reclutamiento inicial*** y el ***reclutamiento cíclico*** (*Figura 6*).

El ***reclutamiento inicial*** se da de una forma continua, comenzando en el preciso momento en que se han formado los folículos, mucho antes de la pubertad y es el responsable de que los folículos primordiales abandonen su estado de reposo y comiencen una etapa de crecimiento. Durante este proceso, algunos factores de transcripción y otros factores que actúan de manera endócrina o parácrina, estimulan a un grupo de folículos primordiales a iniciar el crecimiento, mientras el resto permanece senescente durante meses o años (ver sección 1.2.). Este proceso podría deberse asimismo a la liberación de estímulos inhibitorios que hasta ese momento mantenían los folículos en reposo (McGee & Hsueh 2000).

En contraste con el reclutamiento inicial, el ***reclutamiento cíclico*** comienza después de la pubertad como resultado de un aumento en los niveles de la FSH circulante, que durante los ciclos reproductivos se secretará en forma pulsátil. Esto permite que una cohorte de folículos en fase antral sea rescatada del proceso de atresia. En este momento los folículos completaron su crecimiento, adquirieron la zona pelúcida y se encuentran competentes para reasumir la meiosis. De este modo, solo un número de folículos sobrevivirá, mientras que el resto entrará en atresia.

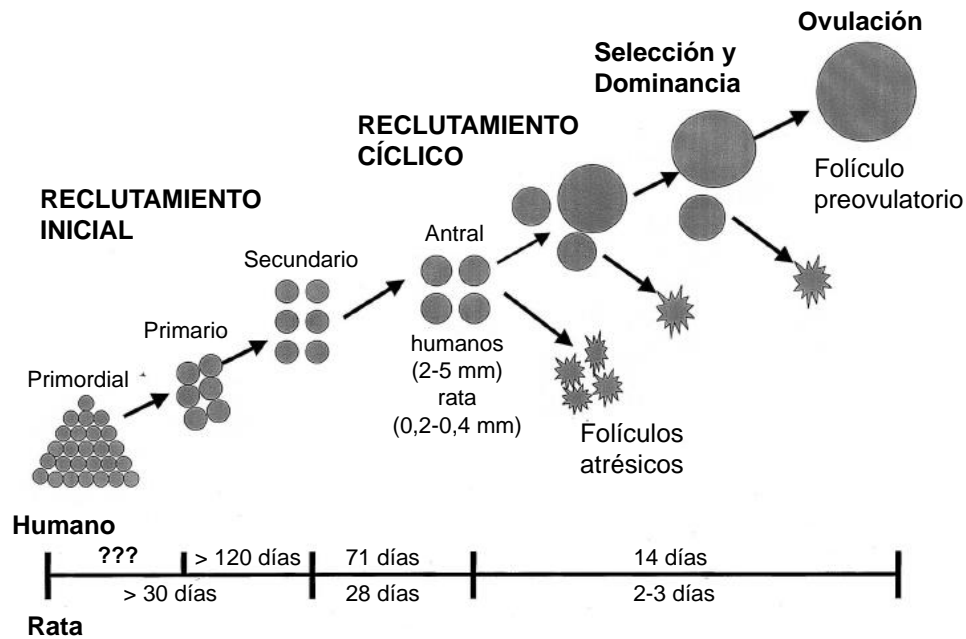


Figura 6. Esquema representativo de la duración del reclutamiento y selección de los folículos en humano y rata. Modificado de (McGee & Hsueh 2000).

## 2.4. Regulación intraovárica del desarrollo folicular

Los mecanismos que controlan el inicio del crecimiento de los folículos han sido difíciles de investigar debido a que se trata de un proceso prolongado, caracterizado por un crecimiento lento de un número determinado de folículos. Se postula que las gonadotrofinas, especialmente la FSH, serían las responsables del desarrollo temprano del folículo (Knobil & Neill 1994). Sin embargo, los efectos ejercidos por las gonadotrofinas en el estadio primordial no se darían de forma directa ya que estos folículos no poseen receptores funcionales para estas hormonas y además, se describió que el inicio del crecimiento folicular puede darse *in vitro* en ausencia de FSH (Gougeon & Busso 2000). Aunque estos receptores no se desarrollan hasta la etapa de folículo secundario, las células de la pregranulosa y los folículos primordiales responden a activadores de la vía del AMPc. Es probable, entonces, que activadores endógenos de esta vía jueguen un importante papel en la diferenciación de los folículos luego del reclutamiento inicial (Mayerhofer *et al.* 1997).

Se considera que los factores involucrados en la comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa ejercerían un papel pasivo en el reclutamiento inicial de los folículos. Mutaciones en genes como el Ligando Kit (KITL, que se expresa en las células de la granulosa de folículos en crecimiento), provocan que el desarrollo folicular a estadios posteriores al primario sea dificultoso. Este mismo efecto se observó neutralizando con anticuerpos al receptor de c-kit localizado en ovocitos (Kuroda *et al.* 1988), por lo que se estima que este factor es importante en la relación folículo-ovocito (Thomas & Vanderhyden 2006). Asimismo, se propuso que otro factor involucrado sería el Factor de Crecimiento y Diferenciación-9 (GDF-9), perteneciente a la familia de los Factores de Crecimiento Transformantes- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ )/Activina, que es producido por los ovocitos en crecimiento en ratón, rata y humano. Los ratones que presentan mutaciones para este gen, no poseen folículos en estadios posteriores al primario (Dong *et al.* 1996). Se ha demostrado también, que existe una interacción entre los factores KITL y GDF-9, y que esta interacción sería dependiente del estadio folicular y que estaría regulada por FSH (Thomas & Vanderhyden 2006). Si bien estos son sólo algunos ejemplos, se considera que existen múltiples factores que actúan en forma parácrina entre el ovocito y las células somáticas durante el desarrollo temprano del folículo.

En el desarrollo y diferenciación de los folículos preantrales, además de la comunicación ovocito-granulosa, la interacción entre granulosa y teca también cumple un papel esencial. Esta interacción estaría mediada en forma parácrina por factores de crecimiento. Uno de estos factores sería el Factor de crecimiento de fibroblasto-7 (FGF-7 o KGF), secretado por las células mesenquimales precursoras de las células de la teca, que estimula el crecimiento de los folículos preantrales de rata en cultivo. Este factor también interaccionaría con KITL en esta función (Kezele *et al.* 2005). Además, el IGF-I (Factor similar a Insulina-I) actuaría aumentando la respuesta a FSH en las células de la granulosa estimulando la expresión de su receptor en este tipo celular. IGF-I estimula también la expresión de proteínas involucradas en la síntesis de esteroides

como StAR (Devoto *et al.* 1999), CYP11A1 (Urban *et al.* 1990), CYP17 en sinergismo con LH (Simone *et al.* 1993) y la enzima CYP19 (He *et al.* 1994).

## 2.5. Regulación endócrina del desarrollo folicular

Al mismo tiempo que los factores anteriormente mencionados se encuentran actuando de forma parácrina o autócrina, los folículos preantrales responden a la acción de las gonadotrofinas. Luego de la pubertad, las gonadotrofinas permiten la supervivencia y el desarrollo de un número limitado de folículos antrales que llegarán al estadio de preovulatorio. Este proceso se encuentra regulado por gonadotrofinas secretadas de forma cíclica.

En resumen, podemos dividir al crecimiento folicular en tres fases: ***crecimiento preantral***, ***crecimiento tónico*** y ***crecimiento gonadotrófico-dependiente***.

La primera fase de ***crecimiento preantral***, que abarca el pasaje de folículos primordiales a secundarios maduros y cuyo componente significativo es el crecimiento y diferenciación del ovocito, es en un comienzo independiente de gonadotrofinas (pasaje de primordial a primario). Luego (en el pasaje de primario a secundario), comenzaría a actuar la FSH en bajos niveles, secretada por la hipófisis. De hecho, se ha observado que en ratas hipofisectomizadas, el pool de folículos primordiales disminuye en forma más lenta (Halpin & Charlton 1988). Asimismo, para la especie humana se observó que niveles elevados de FSH sérica producen un aumento en la pérdida de folículos primordiales (Flaws *et al.* 1997).

La fase de ***crecimiento tónico*** corresponde a la diferenciación de folículos preantrales (secundarios) a antrales y está caracterizado por un aumento de 600 veces en el número de células de la granulosa, acompañado por un incremento simultaneo de más de 15 veces el diámetro total del folículo (debido también al crecimiento del antro). Probablemente se requieran bajos niveles tónicos de gonadotrofinas para el crecimiento de los folículos, pero el sostén gonadotrófico es necesario si el folículo progresa más allá del desarrollo preantral temprano. Esta fase contrasta

con estadios posteriores del desarrollo donde la atresia depende íntimamente de los cambios cíclicos en los niveles circulantes de FSH.

La fase **gonadotrófico-dependiente**, se caracteriza por un crecimiento exponencial con un aumento de 160 veces la población de las células de la granulosa y estos estadios tardíos son los que dependen absolutamente de la secreción pulsátil de gonadotrofinas, en particular los folículos de mayor tamaño que necesitan el sustento de estas hormonas si van a alcanzar el tamaño ovulatorio. Durante este tiempo ocurre la selección y dominancia folicular (Yen *et al.* 2001) (*Figura 6*). Mientras los folículos en crecimiento son insensibles a cambios hormonales cíclicos, los folículos “seleccionables” son más receptivos a estos cambios. Estos folículos son muy sensibles a la administración de gonadotrofinas exógenas, en especial para la proliferación de las células de la granulosa que aumentan considerablemente en comparación a otros folículos en crecimiento (Gougeon & Testart 1990). El término “selección” fue usado por primera vez por Goodman y Hodgen (Goodman & Hodgen 1983) para indicar el ajuste final que sufre la cohorte de folículos en crecimiento y que hace que pasen a formar parte del grupo de folículos que pueden ser seleccionados para ser ovulados.

## **2.6. Apoptosis**

En el ovario de mamíferos, el 99% de los folículos no alcanzan el estadio de provulatorio y degeneran por el proceso de atresia. En particular, se ha sugerido que las células de granulosa serían las que inician la atresia folicular (Matsuda *et al.* 2012), que ocurre por el mecanismo de muerte celular programada o apoptosis (Chun & Hsueh 1998). Este proceso es el principal mecanismo de muerte celular que sobreviene cuando el daño al ADN es irreparable (Ouyang *et al.* 2012).

La apoptosis se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos específicos de las células que se están muriendo. Existen dos vías principales capaces de inducir la apoptosis; la extrínseca- vía dependiente de receptores - y la intrínseca o vía mitocondrial.

La vía extrínseca involucra interacciones mediadas por receptores transmembrana llamados receptores de muerte y que son miembros de la superfamilia TNF (factores de necrosis tumoral). Cuando a estos receptores se les une su ligando extracelular, son responsables de transmitir la señal de muerte desde la superficie celular hacia el interior de la célula. Los eventos que definen la etapa extrínseca de la apoptosis han sido caracterizados con mayor detalle en los modelos de FasL/FasR y TNF- $\alpha$ /TNFR1 (Elmore 2007).

Por otro lado, la vía intrínseca que inicia la apoptosis, involucra una colección de estímulos- no mediados por receptor- que producen señales intracelulares que desencadenan eventos mediados por las mitocondrias. Las señales intracelulares desencadenadas por esta vía pueden actuar de manera positiva o negativa. Todos estos estímulos causan cambios en la membrana interna mitocondrial que resulta, finalmente, en la liberación hacia el citosol de proteínas pro-apoptóticas. El control y la regulación de estos eventos apoptóticos mitocondriales ocurren por medio de proteínas de la familia Bcl-2, que pueden ser pro o anti- apoptóticas. Hasta la fecha, se han identificado 25 genes de la familia de *Bcl-2* que pertenecen a proteínas pro- apoptóticas, como ser *Bcl-10*, *Bax*, *Bak*, *Bid*, *Bad*, *Bim*, *Bik* y *Blk*, o anti- apoptóticas como *Bcl-2*, *Bcl-x*, *Bcl-XL*, *Bcl-XS*, *Bcl-w* y *BAG*. Estas proteínas tienen una importancia especial, ya que determinan si la célula se comprometerá hacia la apoptosis o abortará el proceso (Elmore 2007).

Ambas vías, la extrínseca y la intrínseca, terminan en la fase de ejecución, considerada la vía final de la apoptosis. En esta fase se activan caspasas ejecutoras que activan endonucleasas citoplasmáticas encargadas de degradar el material nuclear, y proteasas, que degradan las proteínas nucleares y del citoesqueleto. La fagocitosis de las células apoptóticas es el último componente del proceso, que se ve acompañado de una asimetría de los fosfolípidos de membrana y la externalización de fosfatidilserina hacia la superficie de la célula (Elmore 2007).

Se demostró que las proteínas Bcl-2 y Bax regulan la apoptosis en el ovario (Tilly *et al.* 1995, Goodman *et al.* 1998). En particular, Bax induce la apoptosis provocando la permeabilización de las membranas mitocondriales, mientras que Bcl-2 es capaz de bloquear esta inducción formando

heterodímeros con Bax. Un aumento en la relación Bax/ Bcl-2 determina la inducción de la apoptosis, mientras que una disminución en esta relación protege a la célula de la misma (Saatli *et al.* 2009). En particular, el aumento en la expresión de Bax en el ovario se correlacionó con la apoptosis, tanto de las células de granulosa, durante la atresia folicular, como de las células luteales durante la regresión del cuerpo lúteo (Goodman *et al.* 1998).

El sistema FAS también se identificó como uno de los inductores de la apoptosis en las células de granulosa y se demostró que su inducción provocaba la apoptosis en las mismas (Hakuno *et al.* 1996, Sakamaki *et al.* 1997, Matsuda-Minehata *et al.* 2006). Se describió, asimismo, la expresión de FAS en las células de granulosa de folículos antrales atrésicos y se vio que su expresión aumentaba a medida que progresaba la atresia (Kondo *et al.* 1996).

### **3. INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA (IOP)**

Referida comúnmente como Falla Ovárica Prematura (FOP), la IOP se define como amenorrea (de al menos 4 meses) antes de los 40 años, aumento en los niveles séricos de FSH (a niveles menopáusicos) y bajos niveles de estradiol (hipoestrogenismo) (Nelson 2009). Tiene una incidencia del 1% en mujeres menores de 40 años y del 0,1% en menores de 30 (Skillern & Rajkovic 2008). Las pacientes presentan deficiencia estrogénica y anovulación, y manifiestan síntomas vasomotores (calores, sudoración), sequedad vaginal, dispareunia e infertilidad. El 76% de los casos de IOP se desarrollan luego de una pubertad normal y menstruaciones regulares (Bachelot *et al.* 2009). Las mujeres jóvenes que desarrollan IOP mantienen una deficiencia en los esteroides sexuales por un período mayor que el de mujeres con menopausia natural. Esto conduce a un riesgo de osteoporosis significativamente mayor, así como de enfermedad cardiovascular (Maclaran & Panay 2011).

Algunas causas posibles de la IOP incluyen anormalidades cromosómicas (Síndrome de Turner, trisomía del X, mosaicismos, deleciones, translocaciones), mutaciones génicas (*FMRI*, *BMP-15*, *GDF-9*, *FOXL2*, *FSHR*, *LHR*, *FSH-β*, *LH-β*, *INHA*, *GALT*, *AIRE*, entre otros), autoinmunidad

(enfermedad de Addison, Síndrome poliglandular autoinmune, anticuerpos contra receptores de LH y FSH, anticuerpos contra tiroides, entre otros), desórdenes metabólicos (galactosemia, deficiencia en 17 $\alpha$ -hidroxilasa), infecciones y tratamientos iatrogénicos (quimioterapia y radioterapia), que conducen a una disfunción o depleción folicular (Nelson 2009). Sin embargo, en la mayoría de los casos (alrededor del 90%), el desarrollo patofisiológico de la IOP es desconocido. Se ha propuesto que algunos posibles mecanismos moleculares involucrados en la IOP incluirían un ritmo de apoptosis alterado, un bloqueo en la maduración folicular y/o anomalías en la activación de los folículos primordiales, que resultarían en un número reducido de folículos funcionales o en una atresia acelerada (Morita & Tilly 1999, Sullivan & Castrillon 2011). La IOP difiere de la menopausia fisiológica en que la primera posee una disfunción ovárica variable en el 50% de los casos, con un 5 a un 10% de mujeres que logran concebir luego de haber sido diagnosticadas (Rebar & Connolly 1990, Nelson *et al.* 1994, van Kasteren & Schoemaker 1999).

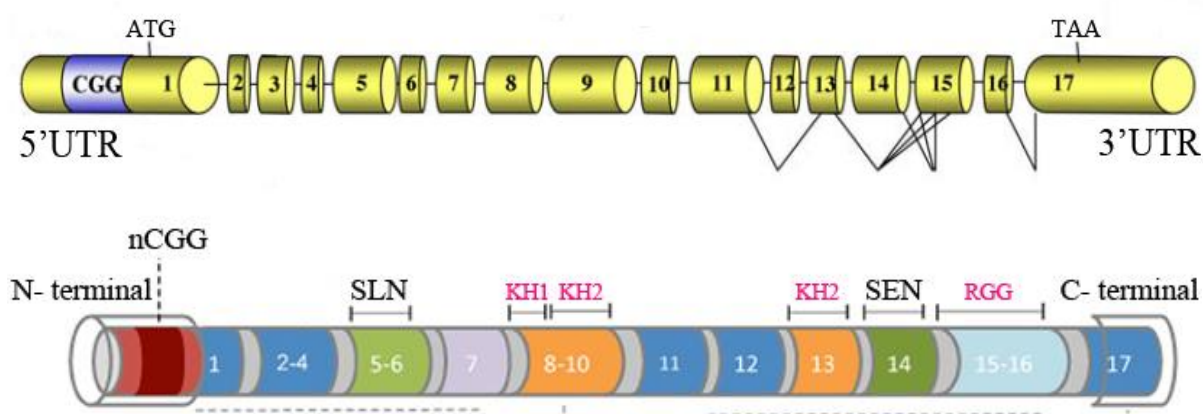
Varios estudios han indicado una gran influencia del acervo genético de la mujer para explicar la variabilidad en la edad de presentación de la menopausia fisiológica (de Bruin *et al.* 2001, Kok *et al.* 2005). Se estima una heredabilidad del 85%, con varios genes que ejercerían un efecto aditivo que contribuirían a esta variación. Se ha descrito, asimismo, que aquellas mujeres que poseen uno o más parientes de primer grado con una historia de menopausia temprana, pueden ellas mismas presentar una menopausia adelantada. Estas observaciones estarían indicando una influencia genética. De hecho, algunos casos de IOP presentan antecedentes familiares, con una incidencia estimada del 4 al 31% (Cramer *et al.* 1995, Vegetti *et al.* 1998, van Kasteren *et al.* 1999). Por su parte existe también una variabilidad en la prevalencia de IOP en mujeres menores de 40 que oscila entre el 0,1-1,4%. Esta variabilidad depende del grupo étnico ya que se estima una prevalencia del 1% para caucásicos, 1,4% para Afro- Americanos, 1,4% para hispánicos, 0,5% para chinos y 0,1% para japoneses, sugiriendo nuevamente, factores genéticos de predisposición o protectivos para el desarrollo de la patología (Luborsky *et al.* 2003).



Dentro de los factores genéticos relacionados a la patología, se halló que mutaciones en los genes *APECED*, *EIF2B*, *FOXL2* y *GALT* resultan en insuficiencia ovárica, pero en general, asociados a otras anomalías (casos sindrómicos) (De Baere *et al.* 2002, Leslie 2003, Fogli *et al.* 2004). Por su parte, se han descripto mutaciones en los genes de los receptores de FSH y LH, en el gen *NR5A1* y en el factor de transcripción específico de ovario *NOBOX* (Qin *et al.* 2007, Lourenco *et al.* 2009, Cordts *et al.* 2011). Sin embargo, en más del 90% de los casos de IOP aislada no se conoce la causa genética que podría estar involucrada en el desarrollo de la patología. Estos resultados demuestran la escasa información que se posee, hasta el presente, acerca de las causas genéticas que influyen en el desarrollo de la IOP en humanos.

#### 4. GEN *FMRI* (FRAGILE X MENTAL RETARDATION 1)

El gen *FMRI* (figura 7), es el gen responsable del Síndrome de Fragilidad del X (SFX) y se identificó en el año 1991 por clonado posicional (Verkerk *et al.* 1991). El SFX es la causa más común del retardo mental hereditario (O'Donnell & Warren 2002).



**Figura 7. Esquema del gen *FMRI* (figura superior) y de su proteína FMRP (figura inferior).** 5'UTR: región 5' no codificante; ATG: codón de inicio de la traducción; TAA: codón de finalización de la traducción; 3'UTR: región 3' no codificante. Las líneas debajo de los exones del gen representan los sitios de *splicing* alternativo. La región azul del gen representa las repeticiones CGG variables en la población. La media de repeticiones en la población normal es de 29-30 triplete CGG. nCGG: repeticiones CGG; SLN: señal de localización nuclear; SEN: señal de exportación nuclear; KH1, KH2 y RGG: dominios de unión al ARN. Los números indican los diferentes exones. Modificado de (Zalfa & Bagni 2004) y (Fernandez *et al.* 2013).

La frecuencia estimada del SFX es de 1/4000 en hombres y 1/7000 en mujeres, siendo las principales características del síndrome una discapacidad de moderada a severa en hombres, macroorquidismo, cara alargada y orejas grandes. Algunos de los pacientes con SFX pueden mostrar rasgos autistas y sufrir de epilepsia. Las mujeres también pueden estar afectadas, pero presentan un fenotipo menos severo que los hombres, que dependerá del grado de inactivación del cromosoma X con la mutación completa (causante de la enfermedad, explicado más abajo) (Willemsen *et al.* 2011). Sólo un tercio de las mujeres afectadas presentan retardo mental (Bagni *et al.* 2012).

El gen *FMRI* Se localiza en el sitio FRAXA en el brazo largo del cromosoma X (Xq27.3), está compuesto por 17 exones (*figura 7*), abarca aproximadamente 38 kilobases (kb) y su producto transcripcional es un ARN mensajero (ARNm) de 3,9 kb que puede sufrir *splicing* alternativo y generar, por lo tanto, diferentes isoformas (Eichler *et al.* 1993, Verkerk *et al.* 1993). Se ha sugerido que el pre-ARNm transcripto del gen *FMRI* puede generar hasta 20 isoformas diferentes de ARNm maduro (Eichler *et al.* 1993). La isoforma más larga de ARNm en humanos codifica para una proteína de 71 kDa que contiene una variedad de secuencias y dominios funcionales (Sittler *et al.* 1996, Denman *et al.* 2004, Dolzhanskaya *et al.* 2006b).

La región 5' no codificante del gen *FMRI* (*figura 7*) presenta una zona de tripletes CGG cuyo número es variable en la población. En la población normal esta variabilidad oscila entre 5 y 44 repeticiones, siendo la media de 29-30 repeticiones.

Según la cantidad de tripletes en la región 5' UTR, los alelos de los individuos se clasifican en **normales** (5- 44 repeticiones), **intermedios** (45-54 repeticiones), **premutados** (55- 200 repeticiones) o con **mutación completa** (>200 repeticiones) (Fu *et al.* 1991, Oberle *et al.* 1991, Rousseau *et al.* 1995). La mutación completa resulta generalmente en la hipermetilación de la región CpG del promotor del gen (Bell *et al.* 1991). Este evento de hipermetilación conduce al silenciamiento del gen con la subsiguiente ausencia de la proteína. La ausencia o inactividad de FMRP es la responsable del SFX.

Si bien no se conoce en detalle el mecanismo molecular responsable de la expansión del número de tripletes, se ha sugerido que las expansiones ocurren en su mayoría en las gametas por un proceso que involucra una aberración en el mecanismo de duplicación y/o reparación del ADN, debida al deslizamiento de las enzimas sobre los fragmentos con las repeticiones (Jin & Warren 2000, Lokanga *et al.* 2013).

Los alelos normales son muy estables al transmitirse de padres a hijos. Un número de repeticiones CGG entre 45 y 54 se considera un estado intermedio. Si bien este estado del alelo no se expande a mutación completa en una generación, potencialmente puede hacerlo en dos o más (Terracciano *et al.* 2004, Cronister *et al.* 2008, Fernandez-Carvajal *et al.* 2009). Los alelos premutados, por su parte, son muy inestables y pueden expandirse a mutación completa en una sola generación. La expansión de un alelo premutado al estado de mutación completa ocurre casi exclusivamente cuando es transmitido de madre a hijo y no cuando se transmite de padre a hija. Los hombres con la mutación completa presentan únicamente alelos premutados en sus espermatozoides (Reyniers *et al.* 1993), presumiblemente porque la mutación completa no sería tolerada por los mismos. A su vez, se ha documentado en varios estudios que el riesgo de expansión a mutación completa a partir de la premutación durante la transmisión materna, es mayor al aumentar el largo de los tripletes (Nolin *et al.* 2013). Por otro lado, la región de tripletes CGG puede presentar interrupciones AGG que se asociarían con la inestabilidad del alelo y el riesgo de expansión a mutación completa. De hecho, en un trabajo reciente se demostró que alelos sin interrupciones AGGs presentan un mayor riesgo a la inestabilidad y expansión al estado de mutación completa (Nolin *et al.* 2013).

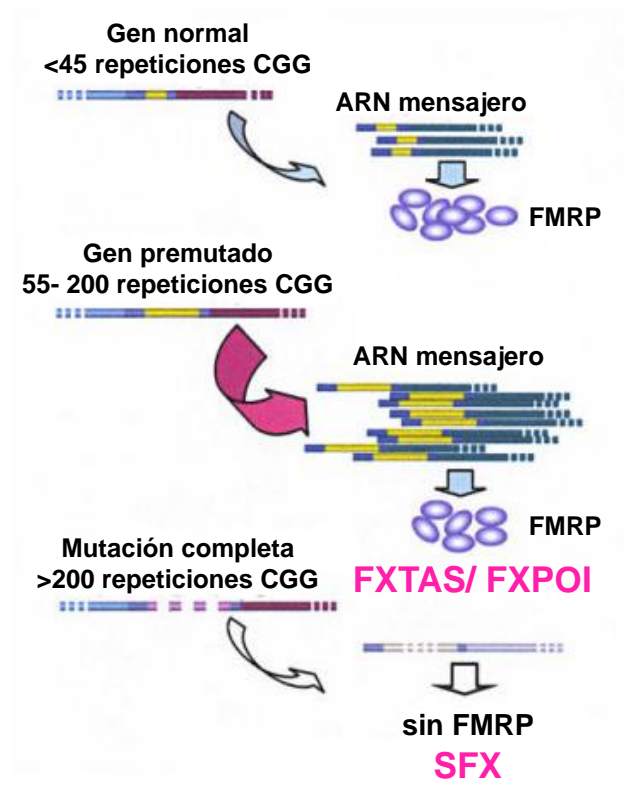
Un hallazgo interesante es que los individuos que son portadores de la premutación presentan niveles aumentados del mensajero de *FMRI* en linfocitos (entre 5 y 10 veces respecto a controles normales). Este aumento se debe a una tasa de transcripción aumentada del gen y no a un aumento en la estabilidad del mensajero (Tassone *et al.* 2000, Kenneson *et al.* 2001, Allen *et al.* 2004, Tassone *et al.* 2007). En modelos animales de la premutación, también se observó que existen

niveles aumentados del ARNm de *Fmr1* en cerebro (Brouwer *et al.* 2007, Berman & Willemsen 2009). Aunque se desconoce el mecanismo preciso que lleva a la sobreexpresión del mensajero, es posible que el incremento en la longitud de los tripletes CGG cercanos al promotor del gen resulte en una cromatina más laxa, permitiendo un mejor acceso a los factores de transcripción. Sin embargo este aumento en los niveles del ARNm en portadores de la premutación, no es coincidente con un aumento en los niveles de la proteína FMRP, ya que los niveles de la misma son normales o bien pueden encontrarse ligeramente disminuidos. Una posible explicación para esta paradoja es que las largas expansiones CGG impidan el correcto ensamblado de la subunidad ribosomal 40S sobre el mensajero de *Fmr1* y por ende el comienzo de la traducción (Li & Jin 2012). Es posible que tal impedimento se deba a la estructura secundaria que adopta el mensajero con tripletes expandidos (Ofer *et al.* 2009).

Si bien la relación entre el estado de mutación completa y el SFX se conoce desde hace dos décadas, en los últimos años se describió que el estado de premutación en el gen *FMRI* está asociado a otros dos desórdenes clínicos: el *Síndrome de temblor/ ataxia asociado a la Fragilidad del X*, *FXTAS*, un desorden neurodegenerativo de inicio tardío y a la *Insuficiencia Ovárica Primaria asociada a la Fragilidad del X*, *FXPOI* (Figura 8).

En algunos pacientes con *FXTAS* que se han podido estudiar *post mortem*, se observó un aumento de la expresión del ARNm en cerebro (Tassone *et al.* 2004a). La presencia de niveles aumentados de ARNm con tripletes expandidos en portadores de la premutación, junto a la aparición de inclusiones intranucleares en neuronas y astrocitos de pacientes con *FXTAS*, en modelos animales del síndrome y en células progenitoras o líneas celulares de origen neuronal, llevó a postular un mecanismo de ganancia tóxica del ARN como posible causa subyacente al desarrollo del síndrome (Arocena *et al.* 2005, Greco *et al.* 2006, Hoem *et al.* 2011, Li & Jin 2012, Pretto *et al.* 2013). De hecho, en otros tejidos fuera del sistema nervioso central (como ser corazón, testículos, glándula adrenal y ganglios de los nervios periféricos), se halló también presencia de inclusiones, tanto en individuos con *FXTAS* como en modelos animales (Garcia-Arocena & Hagerman 2010,

Hunsaker *et al.* 2011). Existe una fuerte evidencia que sugiere la existencia de un evento desencadenante que involucra el secuestro de una o más proteínas por parte del ARNm con los tripletes expandidos y que el mecanismo de ganancia tóxica del mensajero implica el secuestro de proteínas de unión al ARN, reduciendo de esta forma su capacidad de llevar a cabo sus funciones normales (Hagerman & Hagerman 2013).



**Figura 8. Esquema de los dos mecanismos que conducen FXTAS y a SFX, dependiendo del tamaño de la repetición CGG.** FXTAS: Síndrome de temblor/ ataxia asociado a la Fragilidad del X; FXPOI: Insuficiencia Ovárica Primaria asociada a la Fragilidad del X; SFX: Síndrome de Fragilidad del X.

Varios estudios han relacionado el efecto tóxico del ARNm de *FMR1* con un aumento de la muerte celular. Diferentes grupos describieron una disminución en la viabilidad celular al transfectar células con tripletes en el rango de la premutación. Handa y col. (Handa *et al.* 2005) hallaron un aumento en la probabilidad de muerte celular en células Flp-In<sup>TM</sup>-293 conteniendo 176 tripletes CGG, mientras que otros dos grupos encontraron una reducción en la viabilidad celular en células neuronales humanas SK que expresaban 88 o 95 tripletes CGG (Arocena *et al.* 2005, Hoem *et al.* 2011).

Por su parte, Lu y col. (Lu *et al.* 2012), trabajando en un modelo de ratón para FXPOI portador del alelo con 90 repeticiones, observaron que muchos de los folículos antrales tempranos eran atrésicos y contenían células de granulosa apoptóticas. A partir de estas observaciones, los autores sugirieron que el estado de premutación induciría un aumento de la apoptosis en los folículos ováricos

#### 4.1. FMRP (FRAGILE X MENTAL RETARDATION PROTEIN)

La proteína FMRP pertenece a una pequeña familia de proteínas de unión al ARN (*figura 7*). Contiene en su secuencia varios motivos que están implicados en la unión al ARN: dos dominios KH (hnRNP-K-homology) y un dominio arginina- glicina-glicina (RGG box). La presencia de señales de localización y exportación nuclear en la proteína, sugieren que la misma se desplaza entre el núcleo y el citoplasma, si bien su localización es mayoritariamente citoplasmática. En el citoplasma, la proteína se encuentra asociada a polirribosomas formando parte de partículas de mensajeros y ribonucleoproteínas (RNPm) (Devys *et al.* 1993).

Varios trabajos que abordaron la función de FMRP sugieren que la proteína entra al núcleo para unirse a sus ARNm blanco y luego dirigirlos hacia el citoplasma (Eberhart *et al.* 1996). Los complejos de FMRP-RNPm contienen otras proteínas, entre ellas sus homólogas autosomales FXR1P y FXR2P (Tamanini *et al.* 1996, Ceman *et al.* 1999, Ceman *et al.* 2000). Asimismo, se ha sugerido que las diferentes isoformas de la proteína que se producirían por *splicing* alternativo del gen *FMRI*, podrían unirse con distintas afinidades a los ARNs (Brown *et al.* 1998), presentar o no la señal de exportación nuclear y poseer regiones de modificaciones post- traduccionales diferentes (Sittler *et al.* 1996, Dolzhanskaya *et al.* 2006b).

Existe una fuerte evidencia que respalda un rol de FMRP en la regulación de la traducción de ARNs mensajeros blanco específicos y que de esta forma se modularía la plasticidad sináptica. Las evidencias señalan a FMRP como represora de la traducción, efecto que se produciría bloqueando tanto el inicio como la elongación de la traducción (Bhakar *et al.* 2012, Santoro *et al.*

2012). Por lo tanto, se ha sugerido que la desregulación de la síntesis de FMRP en la sinapsis neuronal sería uno de los mecanismos responsables de la patofisiología del SFX (Brown *et al.* 2001, Laggerbauer *et al.* 2001, Mazroui *et al.* 2002).

FMRP estaría involucrada en la regulación de la traducción de ARNm en las dendritas, específicamente como respuesta a la acción del glutamato sobre el grupo 1 de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR). La activación de los mGluR causa la ubiquitinación y degradación de FMRP, que genera, posiblemente, un estado de des-represión de los mensajeros blanco de FMRP que pueden entonces comenzar a traducirse. Además, los mGluR activan a la fosfatasa PP2A que desfosforila a FMRP promoviendo la traducción de sus mensajeros blanco. El modelo emergente propone que los receptores mGlu regulan de manera dinámica los niveles de FMRP en la sinapsis, estimulando localmente la traducción de los ARNm blanco de FMRP. Es por este motivo que, en pacientes con SFX, la ausencia de la proteína resulta en una alteración en la síntesis proteica dependiente de los mGluR en la sinapsis (Ronesi & Huber 2008). De hecho, en autopsias de pacientes con SFX, así como modelos animales en ratón, se observan neuronas con espinas dendríticas densas e inmaduras (Hinton *et al.* 1991, Comery *et al.* 1997, Irwin *et al.* 2001, Nimchinsky *et al.* 2001, Garber *et al.* 2008).

Los resultados de varios estudios realizados por diferentes grupos de investigación, sugieren que uno de los mecanismos por los cuales FMRP podría modular la traducción de ARNs mensajero sería a través de la vía de los microARNs. En *Drosophila* se demostró una interacción de *dFmr1* con AGO2 y Dicer, ambos componentes de la maquinaria de ARN de interferencia (ARNi), sugiriendo que *dFmr1* sería parte del complejo RISC (Caudy *et al.* 2002, Ishizuka *et al.* 2002). De forma similar, se describió que la proteína FMRP de mamíferos interactúa *in vivo* con microARNs y con componentes de la vía de generación de los mismos (Jin *et al.* 2004).

FMRP puede fosforilarse y metilarse en los residuos arginina (Siomi *et al.* 2002, Stetler *et al.* 2006). Se ha sugerido que la fosforilación modularía determinadas propiedades de la proteína, tales como su asociación con polirribosomas durante el proceso de traducción y su interacción con

Dicer (Ceman *et al.* 2003, Cheever & Ceman 2009). La metilación, por su parte, afectaría su interacción con otras proteínas y con ARNs (Denman 2002, Dolzhanskaya *et al.* 2006a, Stetler *et al.* 2006, Blackwell *et al.* 2010, Blackwell & Ceman 2012).

Es de destacar que, si bien la expresión FMRP es ubicua, la misma se expresa con mayor abundancia en neuronas y testículos (Devys *et al.* 1993, Tamanini *et al.* 1997, Bakker *et al.* 2000), dos tejidos que se ven afectados en pacientes con SFX (que presentan discapacidad intelectual y macroorquidismo).

A pesar de su expresión generalizada, la función y expresión de FMRP ha sido poco estudiada en tejidos no-neuronales, si bien existen algunos estudios que sugerirían una función especial de la proteína también en el tejido ovárico. De hecho, estudios con *Drosophila* mutantes para *dFmr1* demostraron que el gen es necesario para el mantenimiento y la represión de la diferenciación de la línea germinal en el ovario, posiblemente a través de la vía de los microARNs (Yang *et al.* 2007). A su vez, otro modelo del SFX en *Drosophila* demostró que FMRP controla la proliferación de la línea germinal durante la ovogénesis a través de la regulación de la expresión del gen *cbl* en el ovario en desarrollo (Epstein *et al.* 2009).

Si bien los estudios en ovarios de mamíferos son escasos, se ha descrito en ratones un aumento en la expresión del ARN mensajero de *Fmr1* durante la proliferación de células germinales (Bachner *et al.* 1993). Bakker y col. (Bakker *et al.* 2000), por su parte, describieron la expresión de la proteína en células germinales primordiales en ratones hembra y en células foliculares en el adulto. Asimismo, trabajos recientes de Hoffman y col. (Hoffman *et al.* 2012) y Lu y col. (Lu *et al.* 2012) describieron la expresión de FMRP en células de granulosa y células luteales en ratón, así como en el ovocito. La expresión de la proteína en ovarios de mujeres de diferentes edades también fue descrita, principalmente en el ovocito y en células de la granulosa (Schuettler *et al.* 2011, Willemsen *et al.* 2011). Se ha estudiado asimismo la expresión del ARNm de *Fmr1* en varios tejidos de ratón adulto, entre ellos el ovario, en el que se detectó baja expresión en el



estroma y un aumento del ARNm en folículos en desarrollo, consistente con la expresión en células de granulosa (Hinds *et al.* 1993).

#### **4.2. INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA ASOCIADA A LA FRAGILIDAD DEL X (FXPOI)**

En los últimos años se evidenció que existe una alta asociación entre el estado de premutación en el gen *FMRI* y la presencia de IOP. De hecho, en la actualidad, FXPOI es la causa genética conocida más común de IOP 46, XX. Aproximadamente el 4- 6% de las mujeres 46, XX con IOP aislada y el 14% de la mujeres 46, XX con IOP familiar, son portadoras de la premutación en el gen *FMRI* (Wittenberger *et al.* 2007). Asimismo, si bien la IOP ocurre aproximadamente en el 1% de la población general, hasta un 24% de las mujeres portadoras de la premutación desarrollan la patología (Allingham-Hawkins *et al.* 1999, Sherman 2000a).

Existe una variabilidad clínica en las funciones reproductivas de mujeres con la premutación, aunque las causas de esta variabilidad no se comprenden con claridad. De hecho, es curioso que sólo alrededor del 20% de las mujeres con premutación desarrollen IOP. Si bien aparentemente son menos los años reproductivos en mujeres con la premutación, no parecieran haber diferencias en la edad de la menarca entre mujeres que son portadoras de premutación y mujeres que no la poseen (Hundscheid *et al.* 2003, Allen *et al.* 2007). Sin embargo, las mujeres portadoras de la premutación experimentan la menopausia, en promedio, 5 años antes que las no portadoras (Murray *et al.* 2000, Sullivan *et al.* 2005) y por lo tanto se enfrentan a la aparición de condiciones asociadas con la deficiencia estrogénica como ser el aumento en el riesgo de osteoporosis y de enfermedades cardiovasculares. Existen asimismo evidencias de envejecimiento ovárico temprano en mujeres portadoras de la premutación en el gen *FMRI*. Los ciclos menstruales son más cortos que en mujeres no portadoras de la misma, a expensas de una disminución en la longitud de la fase folicular, característico de un envejecimiento reproductivo normal (Welt *et al.* 2004).

Estudios genéticos epidemiológicos sugieren que el comienzo y la gravedad de la disfunción ovárica asociada a FXPOI es variable y podría estar modulada, potencialmente, por el largo de las repeticiones CGG y otros factores ambientales (Sullivan *et al.* 2011). Asimismo, existen varias consecuencias debidas a la premutación en *FMRI*: 1- genéticamente, son alelos inestables ya que pueden expandirse a mutación completa durante la transmisión por la línea germinal (Hagerman & Hagerman 2002) y por lo tanto dar lugar a un bebé con SFX; 2- alelos premutados que presentan un número grande de tripletes CGG podrían llevar a una disminución en la producción de la proteína FMRP, debido a que las repeticiones CGG en el ARN impedirían la ubicación del complejo de iniciación de la traducción (Feng *et al.* 1995).

Existen trabajos en los que se han medido los niveles del ARNm de *FMRI* en sangre de mujeres portadoras de la premutación (Allen *et al.* 2004, Hessler *et al.* 2005, Garcia-Alegria *et al.* 2007). Sin embargo, solamente en uno de ellos evaluaron los niveles del mensajero diferenciando entre mujeres que desarrollaron o no IOP (Tejada *et al.* 2008). En este trabajo no encontraron diferencias significativas en los niveles del ARNm de *FMRI* entre mujeres con y sin IOP, aunque sí encontraron diferencias al estudiar la relación entre la cantidad de tripletes CGG y los niveles del mensajero, sólo en el grupo de mujeres con IOP. Considerando sus resultados, los autores sugirieron que los niveles elevados del ARNm en mujeres con la premutación podrían estar asociados al desarrollo de la IOP.

Los mecanismos moleculares exactos, responsables de la disfunción ovárica en mujeres premutadas, no son del todo conocidos. Estudios recientes, en particular en portadoras de la premutación y en modelos animales, arrojaron algunas ideas al respecto. Al parecer, el tamaño de la expansión CGG en el gen *FMRI* está asociado a la gravedad de FXPOI de una manera no lineal. En varios estudios se encontró que el comienzo de la insuficiencia ovárica ocurre más tempranamente, en promedio, en mujeres con 80-100 tripletes CGG (Ennis *et al.* 2006, Allen *et al.* 2007, Tejada *et al.* 2008). Además, el riesgo de menopausia a los 40 años resultó ser más alto en mujeres portadoras de tripletes en este rango.

Se han desarrollado varios modelos de ratones *knock-in* (KI) portadores de los tripletes CGG en el rango de la premutación. Entre ellos, en dos trabajos recientes se analizó el efecto de la presencia de estos tripletes en el ovario. Por estudios histológicos, Hoffman y col. (Hoffman *et al.* 2012) describieron anomalías ováricas en ratones portadores de 130 repeticiones CGG como ser una disminución más rápida en el número de folículos con la edad, una mayor incidencia de quistes ováricos, un número reducido de células de granulosa y niveles aumentados de ubiquitina en el ovocito. Por otro lado, la caracterización de los ratones portadores de 90 repeticiones reveló que el ARN con la premutación disminuyó la fertilidad en hembras, redujo el número de folículos en crecimiento y alteró los niveles séricos hormonales (Lu *et al.* 2012).

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El grupo de trabajo en el cual me incorporé para el desarrollo de esta tesis doctoral, lleva más de 30 años abocado al estudio de las causas asociadas a la Insuficiencia Ovárica Primaria (IOP).

Los primeros resultados dieron cuenta de la presencia de anticuerpos anti Receptor de FSH (R-FSH) en algunas pacientes diagnosticadas con una forma folicular de IOP denominada Síndrome de Ovario Resistente (SOR) (Chiauzzi *et al.* 1982, Chiauzzi *et al.* 2004). La caracterización del antígeno de 55 kDa contra el cual estaban dirigidos los anticuerpos demostró que se trataba de la proteína  $\alpha$ -enolasa (Sundblad *et al.* 2006a).

En los últimos años además, se iniciaron estudios tendientes a dilucidar las causas genéticas asociadas a la IOP. Inicialmente se estudió la presencia de mutaciones en el R-FSH en pacientes con IOP y SOR y con posterioridad se estudió la presencia de posibles mutaciones en el gen de la subunidad  $\alpha$  de la Inhibina. En el trabajo en el que se estudió el R-FSH en una población de pacientes argentinas, no se encontraron alteraciones en la secuencia de ADN del gen, indicando que no existiría una asociación entre mutaciones en el receptor y la IOP (Sundblad *et al.* 2004). Por su parte, el estudio de la subunidad  $\alpha$  de la Inhibina demostró que, a diferencia de lo que se ha descrito, las variantes -16C>T y 769G>A de la subunidad  $\alpha$  no estarían asociadas a IOP (Sundblad *et al.* 2006b). Asimismo, se analizó la asociación entre la presencia de algunos polimorfismos en el R-FSH y la presencia de IOP. Los resultados indicaron que los genotipos 919GG y 2039GG en el gen del receptor, aunque no representarían un factor de riesgo para el desarrollo de la IOP, sí podrían estar asociados a una manifestación más severa de la patología (Sundblad *et al.* 2010).

Por otra parte, estudios ya enfocados a la asociación entre estado de premutación en el gen *FMR1* y la IOP, revelaron que: a) el número de repeticiones más frecuente se encontraba entre 26 y 30 tripletes y b) el 2,6% de las pacientes con IOP presentaron >50 tripletes CGG a diferencia del 0,34% en el grupo control (Chiauzzi *et al.* 2010). Estos resultados concuerdan con lo comunicado

para otras poblaciones acerca de la asociación entre el estado de premutación y el desarrollo de IOP.

Sin embargo, tanto de los antecedentes de la literatura como de los trabajos realizados en nuestro grupo, quedaban algunas interrogantes que nos resultaban interesantes abordar a los efectos de avanzar en el conocimiento de las causas asociadas a la IOP.

Considerando que:

- El estado de premutación en el gen *FMRI* se ha asociado a dos síndromes, el Síndrome de Temblor y Ataxia asociado a Fragilidad del X (FXTAS) y a la Insuficiencia Ovárica Primaria asociada a la Fragilidad del X (FXPOI)
- Hasta un 24% de las mujeres portadoras de la premutación desarrollan IOP frente a ~1% en la población normal
- Se ha descripto que individuos portadores de la premutación presentan niveles aumentados del mensajero de *FMRI*
- Si bien la expresión de FMRP es ubicua, su función en tejidos no neuronales es prácticamente desconocida
- En *Drosophila*, el gen *dFmr1* es necesario para el correcto desarrollo de la línea germinal
- Se ha descripto un aumento en la expresión del ARN mensajero de *Fmr1* durante la proliferación de células germinales en ratones
- La expresión de *FMRI* no ha sido estudiado en detalle en el tejido ovárico de mamíferos
- Se desconoce si el gen *Fmr1* presenta expresión diferencial a lo largo de la foliculogénesis
- Se desconoce el efecto patogénico relacionado a la presencia de tripletes expandidos en células ováricas,

Proponemos las siguientes **HIPÓTESIS DE TRABAJO**:

1. El gen *FMRI* presenta expresión diferencial a lo largo del desarrollo folicular.
2. En células ováricas, la presencia de un número aumentado de repeticiones CGG en la región 5' UTR de un gen reportero, provoca un aumento los niveles de ARNm del mismo.
3. La presencia de un número aumentado de repeticiones CGG en la región 5' UTR de un gen reportero, provoca cambios en la expresión de genes relacionados con la apoptosis celular.

A los efectos de comprobar esta hipótesis, nos propusimos los siguientes **OBJETIVOS**:

### **Generales**

1. Determinar la expresión del ARN mensajero y de la proteína FMRP en diferentes estadios del desarrollo folicular en un modelo de rata.
2. Analizar los efectos biológicos derivados de la expresión de la región 5' UTR del gen *FMRI* que posee la premutación, en células de ovario en cultivo.

### **Específicos**

- 1.1. Analizar la expresión de FMRP en folículos en distintos estadios del desarrollo folicular.
  - 1.2. Analizar los niveles del ARNm de *Fmr1* durante el desarrollo folicular.
  - 1.3. Analizar la expresión del ARNm de *Fmr1* en folículos antrales tempranos frente a concentraciones crecientes de FSH.
  - 1.4. Identificar y caracterizar las isoformas de *splicing* del gen *Fmr1*.
- 
- 2.1. Analizar la expresión del mensajero de un gen reportero clonado río abajo de la región 5' UTR del gen *FMRI*conteniendo tripletes CGG en el rango normal y en el rango de la premutación, en una línea celular de ovario.

- 2.2. Analizar la expresión endógena de genes relacionados con la apoptosis en células ováricas en cultivo conteniendo la región 5' UTR del gen *FMRI* con tripletes CGG en el rango normal y en el rango de la premutación.



# MATERIALES Y MÉTODOS

## Animales

En todos los experimentos que conforman esta tesis se emplearon ratas hembras (*Rattus norvegicus*) vírgenes prepuberales (18- 23 días) de la cepa Sprague Dawley, del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET). En algunos experimentos se utilizaron, como controles, ratas hembras adultas de 60 días o ratas machos (de las cuales se extrajeron los testículos). Todos los experimentos y protocolos que se realizaron fueron aprobados por el comité de ética del IByME y llevados a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del NIH (Instituto Nacional de la Salud, USA). Los animales se encontraban en el bioterio en condiciones controladas de temperatura (21-23°C) y con un fotoperiodo de 12hs luz: 12hs oscuridad (las luces se encienden a las 7:00hs y se apagan a las 19:00hs), recibiendo alimento balanceado y agua *ad libitum*.

## Tratamientos realizados para la obtención de ovarios en distintos estadios del desarrollo folicular

Para los experimentos se utilizaron 3 grupos de ratas:

*Grupo 1. Ratas prepuberales:* Se utilizaron ratas de 18 días a las cuales no se les realizó ningún tratamiento. Los ovarios de este grupo de ratas contienen principalmente folículos preantrales.

*Grupo 2. Ratas DES:* Las ratas se inyectaron durante tres días consecutivos con dietilestilbestrol (DES, Sigma Chemical Co.) disuelto en aceite de maíz, en una dosis de 1 mg/rata/día. Esta hormona posee actividad estrogénica y favorece el reclutamiento folicular múltiple, logrando que los folículos ováricos comiencen su desarrollo hasta la etapa de antral temprano. Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la administración de la última dosis de DES.

*Grupo 3. Ratas PMSG:* Se inyectaron los animales con una dosis única de 25UI/ rata de gonadotrofina coriónica equina (eCG), también llamada PMSG (Novormon, Syntex S.A. Buenos Aires, Argentina). Esta hormona posee actividad FSH e induce el múltiple desarrollo y

reclutamiento folicular enriqueciendo a los ovarios con folículos preovulatorios. Las ratas fueron sacrificadas 48 horas luego de la administración de la hormona (Li *et al.* 1998).

En todos los casos, los animales se sacrificaron por asfixia con CO<sub>2</sub> y los ovarios fueron removidos y limpiados del tejido adherente.

De cada grupo de ratas y según el experimento a realizar, se utilizó el ovario entero o los folículos aislados.

En el caso de utilizar ovario entero, los mismos fueron removidos y desgrasados en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium- Ham's F-12 (DMEM- F12, Gibco Laboratories) con HEPES (Sigma Chemical Co.) conteniendo 1,2 g/l de bicarbonato de sodio en una placa sobre hielo. Los ovarios se guardaron a -70°C hasta su uso.

### **Aislamiento de folículos**

Para el aislamiento de folículos antrales o preovulatorios, los ovarios de las ratas tratadas con DES o con PMSG fueron desgrasados en una placa en hielo, en medio DMEM- F12 conteniendo 1,2 g/l de bicarbonato de sodio. Los folículos antrales (200- 400 µm de diámetro) o preovulatorios (>400 µm de diámetro) se aislaron por microdissección bajo la lupa, utilizando agujas finas (Parborell *et al.* 2002, Abramovich *et al.* 2009). Los folículos aislados se recogieron y guardaron a -70°C hasta su uso.

Para el aislamiento de folículos preantrales, se extrajeron los ovarios de 6-12 ratas de 18 días y se pincharon con agujas de jeringa 26G1/2 según lo descripto previamente por Flaws *et al* (Flaws *et al.* 1994). El tejido luego se incubó en 2,5 ml de DMEM- F12 con HEPES conteniendo 1,2 g/l de bicarbonato de sodio, con collagenasa (4800 unidades; 217U/mg; Gibco), DNasa (1910 unidades, 10 mg/ml, D4527, Sigma) y 1% de BSA (A7888, Sigma), en baño a 37°C con agitación, durante 20 minutos, para lograr su disociación. El tejido disociado se lavó 3 veces en DMEM-F12 HEPES y se filtró con un filtro de nylon con poro de 210 µm (Small Parts CMN-210, Miramar, FL, USA).

Se descartaron las estructuras excluidas (folículos de diámetro  $>210\ \mu\text{m}$  y cuerpos lúteos) y los folículos de diámetro menor a  $210\ \mu\text{m}$  se consideraron preantrales.

### **Cultivo de folículos**

Se aislaron folículos provenientes de 12 ratas tratadas con DES como se describió anteriormente. Luego del aislamiento, se incubaron aproximadamente 60 folículos por pocillo en una placa de 24 pocillos en  $350\ \mu\text{l}$  de medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium- Ham's F-12 (DMEM- F12, 1:1 vol/vol), conteniendo  $1,2\ \text{g/l}$  de bicarbonato de sodio y con el agregado de fungizona ( $250\ \mu\text{g/ml}$ ), gentamicina ( $10\ \text{mg/ml}$ ), ácido ascórbico ( $50\ \mu\text{g/ml}$ ), transferrina ( $10\ \mu\text{g/ml}$ ), BSA ( $3\ \text{mg/ml}$ ) e insulina ( $5\ \mu\text{g/ml}$ ) (Vitt *et al.* 1998). Los folículos fueron incubados 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ , en condiciones basales (sin FSH) o con concentraciones crecientes de FSH (2, 20, 200 y  $500\ \text{ng/ml}$ , FSH ovina, National Hormone and Peptide Program, USA). Luego de las 24 horas se recolectaron los folículos juntando de a dos pocillos para la posterior extracción del ARN para los ensayos por RT-PCR y de PCR en tiempo real (RT- qPCR). Por otro lado se guardó el medio para la medición de progesterona por la técnica de radioinmunoensayo.

### **Radioinmunoensayo (RIA)**

Para las mediciones de Progesterona se utilizó un antisuero provisto por el Laboratorio del Dr. Niswender (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, CO) en una dilución apropiada a los fines de unir el 37% del  $^3\text{H}$ -esteroide utilizado como trazador ( $25\ \text{pg}$ , aproximadamente  $10000\ \text{cpm}$ ). Luego de la incubación de 16hs a  $4^\circ\text{C}$ , se separó la hormona libre de la unida al anticuerpo por medio del agregado de  $0,2\ \text{ml}$  de una suspensión de carbón 0,5% y dextrano 0,05% en el buffer de ensayo (buffer RIA, apéndice) y posterior centrifugación. Los sobrenadantes completos fueron transferidos a viales de conteo, a los que se les agregó  $2\ \text{ml}$  de solución centellante (Optiphase HiSafe 3, PerkinElmer, USA). La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS 1801, con una eficiencia del 62%.

## **Inmunohistoquímica**

Los ovarios provenientes de los distintos grupos de ratas fueron extraídos y fijados en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 12 horas, luego de las cuales fueron incluidos en parafina. Los cortes del taco de parafina se realizaron cada 50  $\mu$ m con un grosor de 5 micrones cada uno y montados en un portaobjetos.

Las secciones se desparafinizaron con xileno y se rehidrataron mediante lavados con alcohol con graduación decreciente (100%, 96% y 70%). Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% en buffer fosfato salino (PBS, pH 7,2, apéndice) durante 20 minutos, seguida de lavados sucesivos en PBS. La exposición antigénica se logró calentando los cortes en microondas en buffer citrato de sodio 0,01M (pH 6) durante 10 minutos a 600 W. La unión no específica a otros epítopes se bloqueó con 2% de seroalbúmina bovina durante 20 minutos. Luego se incubaron las secciones durante la noche a 4°C en una cámara húmeda con o sin anticuerpo monoclonal contra FMRP en PBS (1/400, clon 1C3, Millipore, MA, USA). Los cortes incubados sin anticuerpo sirvieron de control negativo. Al día siguiente se lavaron las secciones con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario IgG contra ratón conjugado a biotina (1/400, Vector Laboratories) durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de la incubación con el complejo avidina-peroxidasa biotinilada (Vectastain ABC system, Vector Laboratories) por 30 minutos. La inmunoreactividad se visualizó mediante la tinción con diaminobencidina en buffer de revelado (Roche Diagnostics, Alemania), según especificaciones del fabricante. La reacción se frenó con agua destilada y los cortes se tiñeron con hematoxilina (apéndice), deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol (70%, 96% y 100%) seguido de xileno y finalmente se montaron con bálsamo de Canadá (Álwik, Buenos Aires, Argentina). Para la visualización de la posible tinción nuclear, no se realizó la contra-tinción con hematoxilina. La aparición del producto de la reacción de color marrón se observó bajo microscopio.

## **Western blot**

El tejido ovárico proveniente de 3 o 4 ratas o bien un *pool* de folículos provenientes de 12- 24 ratas por tratamiento, se agruparon y resuspendieron en 600 µl de buffer de lisis para folículos (apéndice) suplementado con inhibidores de proteasas (apéndice) y homogenizados a 25000 rpm con un homogenizador Ultra- Turrax (IKA Werk, Breisgau, Alemania).

El resultado obtenido de cada grupo de tejido ovárico o de folículos se consideró como un único dato.

Para obtener una fracción enriquecida en ribosomas, los ensayos se realizaron mediante la metodología descrita por Feng *et al* (Feng *et al.* 1997) con algunas modificaciones. Las muestras se centrifugaron a 16000 x g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido se centrifugó a 150000 x g durante 1 hora a 4°C para obtener un pellet enriquecido con ribosomas. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en buffer urea (apéndice). La concentración proteica se midió por el método de Bradford (Bradford 1976).

Como tejidos control se obtuvieron testículos, cerebro y músculo, que fueron homogenizados y centrifugados como se explicó anteriormente. Los buffers utilizados para cada tejido están descritos en el apéndice. Para la homogenización de los testículos se usó el mismo buffer que para los folículos y ovarios.

En todos los casos (excepto para testículo donde se utilizó 5 µg del extracto proteico), se sembraron 12 µg de proteína en un gel de poliacrilamida al 7,5% con SDS, con el marcador de Peso Molecular (PM) Full- Range Rainbow (GE Healthcare, USA) con rangos de PM que oscilan entre 12000 y 225000 Daltons, y la corrida electroforética se realizó a 25 mA durante 1,5hs. Al finalizar la corrida se transfirieron las proteínas durante 1 hora a 100V a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, USA). Las membranas fueron cortadas teniendo en cuenta el marcador de PM, en 3 secciones: una para revelar FMRP (con isoformas con PM entre 65 y 79 kDa, para lo cual se cortó la membrana a la altura del marcador de 52 kDa), otra para revelar β-actina (con un PM de 43 kDa, cortando a la altura del marcador de 38 kDa) y la sección restante

se utilizó para revelar la proteína ribosomal S6 (cuyo PM es de 32 kDa). Las membranas de FMRP y  $\beta$ -actina se bloquearon a 4°C toda la noche en PBS con leche descremada al 5% y Tween-20 (0,2%), seguido de la incubación durante 2 horas con el anticuerpo monoclonal de ratón contra FMRP 1C3 (1/400) o con el anticuerpo monoclonal de ratón contra  $\beta$ -actina (1/10000 ab-6276 Abcam; Cambridge, Science Park, UK) a temperatura ambiente en PBS con Tween-20 0,2% y 3% de suero de caballo.

La membrana de S6 se bloqueó en la misma solución que las anteriores durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubó con el anticuerpo monoclonal de ratón contra S6 (1/1000, 54D2, Cell Signaling, MA, USA) en la solución de bloqueo a 4°C, toda la noche.

Se utilizó un anticuerpo contra ratón conjugado a peroxidasa como anticuerpo secundario y la señal se detectó por quimioluminiscencia y autorradiografía. Para optimizar la señal observada, las placas radiográficas se expusieron durante diferentes tiempos y los niveles proteicos se densitometraron usando el programa informático Image J (NIH). La densitometría de cada banda se normalizó a la densitometría de la banda de  $\beta$ -actina que se utilizó como control de carga y a la densitometría de S6. Para cada grupo experimental se obtuvieron 3 extractos proteicos independientes.

La estimación de los pesos moleculares de las diferentes isoformas de FMRP se realizó, midiendo con una regla, las distancias de migración en el gel (d) de 3 marcadores (M) de peso molecular conocido. La distancia d se midió a partir del punto de siembra de las muestras en el gel. El valor de movilidad relativa ( $R_f$ ) se calculó de la siguiente manera:  $R_f = d / x$ , siendo x la distancia total recorrida por el marcador de PM que se encuentra en el frente de la corrida (este valor puede ser también la distancia desde el punto de siembra hasta una línea trazada al azar que se encuentre por debajo de la banda de menor PM).

Una vez calculados 3 valores de  $R_f$ , se graficó el logaritmo del PM en función de  $R_f$  y la ecuación lineal obtenida se usó para calcular los pesos moleculares de las isoformas de FMRP.

### **Extracción de ARN para la realización de la retrotranscripción y posterior PCR (RT-PCR)**

Para la realización de RT-PCR se procedió a extraer el ARN total de los folículos aislados, de ovario entero, de tejido testicular, de cerebro y de músculo, así como de las células (KGN y HEK) con Trizol® (MRC, OH, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se homogenizaron en Trizol con homogenizador Ultra- Turrax para el caso de los tejidos (1 ml/ 50-100 mg de tejido) y, en el caso de las células, se agregaron 150 µl de Trizol por pocillo. Para la extracción a partir de las células se agruparon de a 3 pocillos (volumen total de 450 µl de Trizol) y se prosiguió con el protocolo. Las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y se les agregó 0,2 ml de cloroformo. Luego de agitar vigorosamente, se centrifugó a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C y a la fase acuosa se le agregó 0,5 ml de alcohol isopropílico seguido de la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C y el pellet resultante se lavó con etanol 75% (1 ml/ 1ml Trizol). A las muestras provenientes de células en cultivo, previo a la centrifugación se les agregó 10 µg de glucógeno para facilitar la precipitación del ARN. Se centrifugó a 7500 x g durante 5 minutos a 4°C y el pellet se dejó secar durante 5-10 minutos. Por último, se resuspendió el pellet en 20-30 µl de agua libre de nucleasas (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina) y las muestras se calentaron a 55°C durante 10- 15 minutos. La concentración del ARN se calculó en un espectrofotómetro SmartSpec 3000 (BIO-RAD, CA, USA) o en NanoDrop (Thermo Scientific) midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

Previo a la síntesis del ADN complementario (ADNc) a partir del ARN extraído de las células, se realizó un paso de degradación del ADN genómico (ADNg) utilizando DNasa (Invitrogen, USA). Este paso se incluyó ya que los genes clonados en plásmidos no contienen intrones y para evitar la contaminación con ADN durante la extracción del ARN. Brevemente, a 0,7- 1 µg de ARN se le agregó 1 µl de buffer DNasa (apéndice), 1 µl de la enzima (1 U) y se llevó a un volumen de 10 µl con agua libre de nucleasas. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se inactivó la enzima agregando 1 µl de EDTA 25 mM.



En el caso de la extracción de ARN a partir de tejido, el paso de degradación con DNasa no fue necesario: Los cebadores para *Fmr1* utilizados para la RT- qPCR están ubicados en los exones 5 y 6 del gen y se encuentran separados por un intrón de 1345 pb. Por lo tanto, y en caso que hubiera ADN genómico contaminante, el fragmento resultante sería de gran tamaño y no podría ser amplificado durante la RT- qPCR.

El ADNc utilizado como molde para la PCR se sintetizó a partir de este ARN con cebadores aleatorios (“random primers”, Biodynamics) y la transcriptasa reversa (RT) M-MLV (Promega, WI, USA) en un volumen final de 25µl durante 1 hora a 37°C, siguiendo las instrucciones del fabricante de la RT.

El ARN de los tejidos usados como control se extrajo de la misma manera.

Para realizar las PCRs a partir de los folículos aislados o del tejido ovárico entero, se usaron 10 ovarios provenientes de 5 ratas prepuberales y 8 ovarios provenientes de 4 ratas tratadas con DES o con PMSG. En todos los casos se utilizó uno de los ovarios para aislar los folículos mientras que el contralateral se conservó entero. Todos los ovarios enteros de las distintas ratas y todos los folículos aislados a partir de todos los ovarios, se agruparon y a partir de ellos se extrajo el ARN.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Las reacciones de PCR se realizaron para estudiar las isoformas de *splicing* de *Fmr1* y para verificar la correcta síntesis del ADNc luego de la reacción de retrotranscripción y previo a los estudios por PCR en tiempo real.

Las PCRs se llevaron a cabo utilizando los pares de cebadores descritos en la *tabla 1* según el fragmento a amplificar, en un volumen final de reacción de 50 µl. La mezcla de reacción consistió en buffer de PCR 1X (Invitrogen, USA, apéndice), 0,2 mM de la mezcla de dNTPs (Promega, USA), 0,5 µM de cada uno de los cebadores específicos, 2,5% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck KgaA, Alemania), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, USA), 1U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, USA) y 1 µl del ADNc. En los casos en los que los productos de PCR se utilizaran

para secuenciación, el volumen final de reacción fue de 100 µl. Se utilizó un ciclador térmico Perkin Elmer (The Perkin-Elmer Corporation, USA) y en todos los casos se realizó una desnaturalización inicial de 90 seg. a 94°C, seguida de 35 ciclos de: 1) 40 seg. de desnaturalización a 94°C, 2) 30 seg. de “annealing” o apareamiento de los cebadores al molde de ADN, a 56 °C y 3) 90 seg. de polimerización a 72°C, seguida de un único ciclo final de 10 min. a 72 °C.

Todos los productos de PCR se chequearon en geles de agarosa 1,5%, diluyendo 5 µl del producto amplificado en 1 µl de buffer de siembra 6X (apéndice). Como buffer de corrida se utilizó TBE 0,5X (apéndice) con 0,05% p/v de bromuro de etidio.

**Tabla 1.** Cebadores utilizados para la amplificación mediante PCR

Gen	Cebador <i>forward</i> (F, 5'- 3')	Cebador <i>reverse</i> (R, 5'- 3')	Referencia
<i>Fmr1</i> set I (11F+ 14R)	GCCACCAAGTTCCTACCTT	CCCATTTCCTTGACCATCATC	Este trabajo (*)
<i>Fmr1</i> set II (14F+ 15R)	GCGGTCCTGGATATACTTCAG	CTTTGAAACCTCCTCCTCTTC	(Xie <i>et al.</i> 2009)
<i>Fmr1</i> set III (15F+ 17R)	GCTCCAACAGAGGAAGAGAG	GGGTACTCCATTACGAGTGG	(Xie <i>et al.</i> 2009)
<i>Fmr1</i> set IV (RT- qPCR)	AGATCAAGCTGGAGGTGCCA	CAGAGAAGGCACCAACTGCC	(Brouwer <i>et al.</i> 2007)
<i>HPRT</i>	GCTGAAGATTTGGAAAAGGTG	AATCCAGCAGGTCAGCAAAG	(Hvid <i>et al.</i> 2011)
<i>BCL-2</i>	TTGGCCCCCGTTGCTT	CGGTTATCGTACCCCGTTCTC	(Ikeguchi <i>et al.</i> 2002)
<i>BAX</i>	TCCCCCGAGAGGTCTTTT	CGGCCCCAGTTGAAGTTG	(Ikeguchi <i>et al.</i> 2002)
$\beta$ - <i>gal</i>	GCGAATACCTGTTCCGTCAT	ACATCCAGAGGCACTTCACC	Este trabajo (*)
<i>GFP</i>	GAGGCACTGGGCAGGTGT	CCGGACACGCTGAACTTGT	(Hoem <i>et al.</i> 2011)
<i>GAPDH</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	(Gonzalez <i>et al.</i> 2010)

\* Los cebadores de este trabajo fueron diseñados utilizando el Primer-BLAST del ncbi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para el set I y el software Primer3 para  $\beta$ - *gal*.

## Secuenciación

Los productos de PCR resultantes de la amplificación con los sets I, II y III de cebadores se corrieron en geles de agarosa al 1,5% o en geles de poliacrilamida al 6 o 8% (para lograr una mejor separación de los productos de PCR) y las distintas bandas se cortaron del gel y purificaron a través de columnas “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos purificados fueron secuenciados por el método de Sanger en Macrogen, Corea.

En los casos en los que no fue posible una correcta visualización de los productos luego de la secuenciación (presencia de dobles pico a lo largo de la secuencia) debido a la contaminación con otros fragmentos, los productos se clonaron en vectores con el kit TOPO TA Cloning (Invitrogen, USA) según las instrucciones del fabricante, y se transformaron bacterias competentes contenidas en el mismo kit de clonado. Las bacterias se crecieron en medio LB (apéndice) durante 1 hora a 37°C en agitación a 250 rpm, y se plaquearon en placas de Petri con LB agar (apéndice) suplementado con 50 µg/ml de ampicilina. Las placas se incubaron en estufa a 37°C entre 16 y 24 horas. Se picaron 8-10 colonias blancas (indicativo de la inserción del fragmento a clonar) y se incubaron en 2 ml de LB suplementado con 50 µg/ml de ampicilina, en agitación durante 4hs. Para la secuenciación del plásmido, se enviaron a Macrogen las diferentes colonias crecidas en un eppendorf con 1,5 ml de LB agar con ampicilina.

En todos los casos, los fragmentos se secuenciaron con el cebador sentido (“*forward*”) y antisentido (“*reverse*”) o con los cebadores comerciales M13, cuando fue necesario clonar el fragmento. Las secuencias se analizaron con el programa FinchTV (Geospiza, Perkin Elmer). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en bases de datos públicas (Nucleotide collection) de rata (*Rattus norvegicus*) utilizando la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante el algoritmo Blast.

## **Estudios de transfección con vectores conteniendo diferente número de tripletes**

### *Amplificación de los plásmidos conteniendo distinto número de tripletes*

#### Preparación de bacterias competentes

Se preparó un cultivo de bacterias DH5 $\alpha$  en LB agar. Se picó una colonia aislada, se inoculó en 7 ml de LB líquido en un erlenmeyer de 125 ml y se incubó con agitación a 37°C hasta una densidad óptica (DO) a 550 nm de 0,3. Se agregaron 5 ml de este cultivo a 100 ml de LB líquido en un erlenmeyer de 500 ml y se incubó con agitación a 37°C hasta una DO a 550 nm de 0,48.

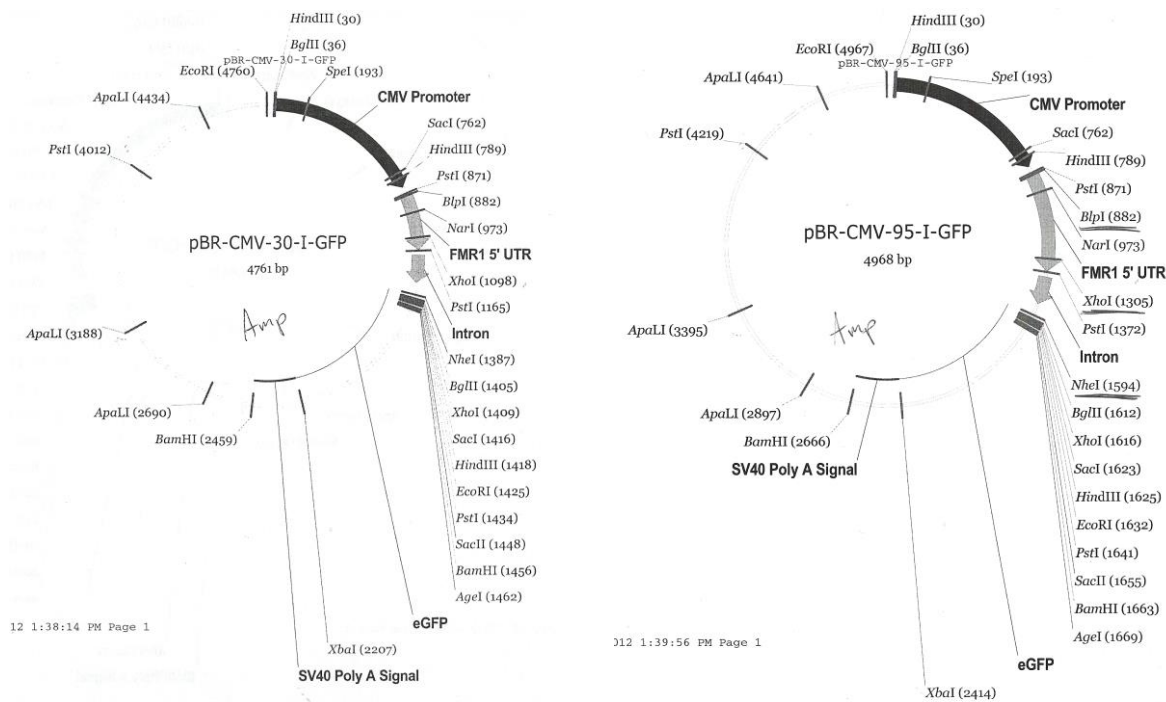
Se enfrió en agua con hielo durante 10 min., se centrifugó durante 5 min. a 4000 x g a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 40 ml de la solución TfbI fría (apéndice), dentro de agua con hielo, hasta que tomó una apariencia perlada. Se incubó en agua con hielo durante 5 min. y luego se centrifugó durante 5 min. a 4000 x g a 4°C.

Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 4 ml de la solución TfbII fría (apéndice) dentro de agua con hielo. Las células se incubaron a durante 15 min. en agua con hielo y se alicuotaron de a 100  $\mu$ l en eppendorfs estériles. Las bacterias competentes se guardaron a -70°C.

#### Transformación de bacterias competentes

Los plásmidos pBR-CMV-30-I-GFP y pBR-CMV-95-I-GFP (gentilmente cedidos por el Dr. Paul Hagerman, Universidad de California, Davis, CA, USA, *Figura 9*) se amplificaron en bacterias competentes.

Para ello se descongeló una alícuota de 100  $\mu$ l de bacterias en hielo, a la cual se le agregó 1  $\mu$ l del vector a amplificar y homogenizó suavemente sin retirar del hielo. Luego de una incubación de 30 min., se realizó un shock térmico a 42°C durante 1 min. y se transfirió inmediatamente a hielo por 2 min. Se agregaron 250  $\mu$ l de medio LB precalentado a 37°C y se incubó 1 hora a esa temperatura con agitación suave (250 rpm). Luego de la incubación se centrifugó 1 min. a 3000 rpm, se descartó el sobrenadante y se sembró el pellet en una placa de Petri con medio LB agar suplementado con ampicilina (50  $\mu$ g/ml). La placa se incubó entre 16 y 24hs en estufa a 37°C.



**Figura 9. Plásmidos pBR-CMV-30-I-GFP y pBR-CMV-95-I-GFP.** CMV promotor: promotor de citomegalovirus; FMR1 5' UTR: región 5' no codificante del gen *FMR1*; *eGFP*: gen reportero de la proteína verde fluorescente; SV40 Poly A Signal: señal de poliadenilación. Se muestran todos los sitios de corte por enzimas de restricción. Los plásmidos contienen 30 (esquema de la izquierda) o 95 (esquema de la derecha) repeticiones CGG en el fragmento FMR1 5' UTR. La digestión con las enzimas XhoI y BlpI resulta en 3 bandas que permiten confirmar la presencia del fragmento 5' UTR de *FMR1*.

### Purificación de plásmidos

Luego de picar algunas colonias de la placa de Petri, se realizaron cultivos de 2 ml en LB con ampicilina (50µg/ml) toda la noche a 37°C y se purificaron los plásmidos para cotejar que no hayan perdido el fragmento de interés (5' UTR de *FMR1*).

Para la purificación de los plásmidos, se centrifugaron 1,5 ml del cultivo a 12000 x g durante 1 minuto a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en 100 µl de solución I fría (apéndice) agitando vigorosamente. Se agregaron 200 µl de la solución II recién preparada (apéndice) y se mezcló por inversión. Los tubos se mantuvieron en hielo. Se agregaron 150 µl de la solución III fría (apéndice) y se mezcló por inversión durante 10 segundos. Se incubó en hielo durante 3-5 min.

Los tubos se centrifugaron a 12000 x g durante 5 min. a 4°C, el sobrenadante se transfirió a otro tubo y se precipitó con 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente a 12000 x g durante 5 min. a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó con 1 ml de etanol 70% y se dejó secar durante 5 min. Por último, el pellet conteniendo el ADN plasmídico se resuspendió en agua con RNasa (20 µg/ml) y se guardó a -20°C hasta su uso.

Para verificar que los plásmidos pBR-CMV-30-I-GFP y pBR-CMV-95-I-GFP no hayan perdido el fragmento 5' UTR, se digirió 1 µl de cada uno con 1 µl de las enzimas XhoI (20000U/ml) y BlnI (10000U/ml) (New England BioLabs) durante 4hs a 37°C. El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 1,5% y se verificó la presencia de las 3 bandas esperadas con sus correspondientes tamaños: 4234, 311 y 216 pb para el plásmido con 30 CGG y 4234, 311 y 423 pb para el de 95 CGG.

Una vez que se confirmó la presencia del fragmento 5' UTR, se realizaron cultivos de 100 ml en LB con ampicilina y se purificaron los plásmidos mediante un kit de purificación siguiendo las especificaciones del fabricante (Plasmid Midi Kit, QIAGEN). Las concentraciones de los plásmidos se midieron con un espectrofotómetro (NanoDrop, Thermo Scientific) y se utilizaron para las posteriores transfecciones celulares.

### **Cultivos celulares y transfecciones**

Para estos estudios se utilizaron 2 líneas celulares: una línea celular proveniente de un tumor de granulosa humano, KGN (proveniente del “Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Science”, Kyushu University, Japón, (Nishi *et al.* 2001)) y la línea celular embrionaria humana de riñón, HEK293 (Invitrogen). Para los experimentos se utilizaron células que no hubieran superado los 10 repiques en cultivo.

Las células KGN se cultivaron en medio DMEM-F12 con 10% suero fetal bovino (Natocor, Argentina) suplementado con bicarbonato de sodio (1,2 g/l, pH 7,4) en estufa a 37°C con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>.

La línea celular embrionaria humana de riñón, HEK293, se cultivó en medio DMEM con 10% suero fetal bovino (Natocor, Argentina) suplementado con 1% de glutamina (Sigma) en estufa a 37°C con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Para los experimentos de transfección, se sembraron, para ambas líneas celulares, aproximadamente 45000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos con 500 µl de medio de cultivo. Al día siguiente se transfectaron las células con el plásmido pBR-CMV-30-I-GFP o con el plásmido pBR-CMV-95-I-GFP y en ambos casos se co- transfectaron con el pCMV- LacZ (Clontech, USA) para relativizar los valores obtenidos de la expresión de *GFP* a los valores de la expresión de *β-gal* y como control de la eficiencia de transfección. En todos los casos se dejaron 6 pocillos sin transfectar como controles negativos de los ensayos de expresión medidos por RT- qPCR.

Las transfecciones se realizaron con el reactivo X- tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche, USA) en una relación ADN:X-treme de 1:1 para las células KGN y de 3:1 para las células HEK. Estas relaciones resultaron ser las óptimas en cada caso luego de testear diferentes combinaciones. Las células se transfectaron con 0,25 µg de ADN/ pocillo durante 18, 24 o 48 horas. Transcurrido el tiempo de transfección, se descartó el medio de cultivo y se agregaron 150 µl de Trizol a cada pocillo para proseguir con la extracción de ARN como se describió previamente.

Para los experimentos de detección de células que expresan la proteína GFP, los pocillos de las placas p24 se dividieron en 4 partes iguales y se sacaron 2 fotos de cada pocillo, siempre en los cuartos izquierdo superior y derecho inferior. Las fotos se tomaron utilizando un microscopio de fluorescencia invertido (OLYMPUS CKX41) con un filtro de excitación en el rango de 460- 490 nm.

### **Estimación del número de tripletes endógenos del gen *FMRI* en las células KGN**

Para estos ensayos se realizó una PCR fluorescente. Para tal fin, el ADN se extrajo a partir de la fase orgánica obtenida durante la extracción de ARN con Trizol descripta previamente, de células

control que no fueron transfectadas. A la fase orgánica resultante de la primera centrifugación a 12000 x g se le agregaron 300 µl de etanol 100%, se mezcló por inversión y se incubó durante 3 min. a temperatura ambiente. Luego de la incubación se centrifugó el tubo a 2000 x g durante 5 min. a 4°C y el pellet obtenido se lavó con 1 ml de una solución 0,1 M de citrato de sodio en 10% de etanol, pH 8,5. Se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente mezclando ocasionalmente por inversión y a continuación se centrifugó a 2000 x g durante 5 min. a 4°C. El pellet obtenido se lavó con la solución de citrato de sodio una vez más y se le agregó 1,5 ml de etanol 100%. Se incubó 10- 20 min. a temperatura ambiente y se centrifugó nuevamente a 2000 x g durante 5 min. a 4°C. El pellet obtenido se dejó secar 5- 10 min. y se resuspendió en 20 µl de agua libre de nucleasas (Biodynamics).

La región genómica de interés se estudió por PCR utilizando cebadores específicos que comprenden la misma: FRA5 (F): 5' GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT 3'; FRA4 (R): 5' AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA 3', que amplifican la región -21 a la +260 del gen *FMRI* (considerando un número de 20 repeticiones CGG, <http://genome.ucsc.edu>), en presencia de una enzima Taq polimerasa (Taq Platinum Pfx, Invitrogen) y con el agregado de betaína como mejorador de la reacción. La región amplificada con este par de cebadores abarca los tripletes CGG, que en la población normal presentan una media de 29-30 repeticiones. Uno de los cebadores, el antisentido, fue marcado con un nucleótido fluorescente (FAM). La mezcla de la reacción consistió en: 3 µl de ADNg (100 ng/µl aprox.), 3 µl Buffer (Kit platinum), 0,9 µl MgSO<sub>4</sub> (Kit platinum), 0,25 µl dNTPs (25 mM), 0,45 µl de cada uno de los cebadores (50 µM), 10 µl PCR Enhancer (Kit platinum), 9,6 µl Betaína (5M, Sigma), 0,35 µl de Pfx y H<sub>2</sub>O csp para 30 µl. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 3 min. a 95°C (desnaturalización) seguido de 40 ciclos de: 1) 15 seg. a 95°C (desnaturalización), 2) 2 min. a 62°C ("annealing") y 3) 2 min. a 68°C (elongación) y una elongación final de 10 min. a 68°C. La banda de amplificación esperada para un alelo de 30 repeticiones CGG es de 311 pb, de los cuales



90 pb corresponden a los tripletes y 221 pb a las regiones adyacentes comprendidas entre los cebadores.

A una alícuota de 0,7 µl de los productos obtenidos en la PCR se le adicionó 0,3 µl de marcador de PM (GeneScan™ - 600 LIZ®, Applied Biosystems) marcado con LIZ y con el agregado de 9 µl de Hi-Di™ Formamida (Applied Biosystems).

Los diferentes fragmentos así preparados fueron separados mediante el uso de un secuenciador automático (ABI PRISM 3500, Applied Biosystem) y analizados mediante el software GeneMarker (SoftGenetics).

### PCR en tiempo real (RT- qPCR)

Se realizó RT- qPCR, para cuantificar:

1. Los niveles del ARNm de *Fmr1* en ratas tratadas con DES o con PMSG,
2. Los niveles del ARNm de *GFP*,  $\beta$ - *gal*, *BCL-2*, *BAX* y *GAPDH* en células KGN y de *GFP* y  $\beta$ - *gal* en las HEK.

Previo a la cuantificación de los niveles de ARNm en las muestras de interés, se realizó el rango dinámico para cada par de cebadores utilizados para calcular la eficiencia (E) de los mismos. Se hicieron diluciones seriadas (1/5, 1/10, 1/50 y 1/100) de una de las muestras y la misma se corrió por RT- qPCR utilizando el par de cebadores que se quiso testear. Cuando se realizó el rango dinámico para evaluar la expresión de los genes de las vías de apoptosis, se utilizaron muestras de células transfectadas con 30 tripletes CGG durante 24hs.

Con los valores de los Ct (ciclo umbral o “threshold cycle”) obtenidos para cada dilución, se graficó el Ct en función del logaritmo de la dilución. A partir del valor de la pendiente de la recta obtenida, se calculó la eficiencia utilizando la fórmula  $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$ . Este paso previo sirve también para saber con qué dilución de la muestra trabajar ya que se busca aquella que resulte en Ct entre 20 y 26.

Para el primer grupo de experimentos se usaron los ovarios enteros o folículos aislados provenientes de 4 ratas. Cada extracto fue analizado individualmente. Para el grupo de ratas prepuberales, se usaron ovarios enteros de 4 ratas o folículos provenientes de 3 grupos diferentes de 6 ratas cada uno. Se utilizó el set IV de cebadores para *Fmr1* y los resultados obtenidos se normalizaron a la expresión del ARNm de *HPRT* amplificado con los cebadores específicos (Tabla 1).

Para cuantificar los niveles del ARNm de *GFP*,  $\beta$ -*gal*, *BCL-2*, *BAX* y *GAPDH* en células KGN y HEK, se juntaron las células de a 3 pocillos como se describió previamente.

Cuando se cuantificó el ARNm de *GFP*, producto de los vectores transfectados, los resultados se normalizaron a la expresión del ARNm de  $\beta$ -*gal* que se transfectó en paralelo. Cuando se cuantificó el ARNm de *BCL-2* y *BAX* endógenos, los resultados se normalizaron a la expresión de *GAPDH* como gen “housekeeping” (ver cebadores correspondientes en Tabla 1).

En todos los casos, se utilizó SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) y el set de cebadores correspondiente.

Todas las reacciones se realizaron en una placa de 96 pocillos, en un volumen final de 25  $\mu$ l conteniendo 12,5  $\mu$ l de 1X de la Master mix, 0,3  $\mu$ M de cada uno de los cebadores y 5  $\mu$ l de la dilución del ADNc. Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 1) 2 min. a 50°C, 2) 10 min. a 95°C , seguidos de 40 ciclos de 15 seg. a 95°C (desnaturalización) y 1 min. a 60°C (annealing y polimerización). Cada muestra se ensayó por triplicado. El ADNc se obtuvo de 2 o 3 experimentos independientes.

Los resultados se analizaron mediante el modelo matemático de Pfaffl para cuantificaciones relativas (Pfaffl 2001) utilizando la fórmula:

Relación=  $E_{\text{gen}}^{\Delta Ct_{\text{gen}}} / E_{\text{housekeeping}}^{\Delta Ct_{\text{housekeeping}}}$  siendo, E: Eficiencia y  $\Delta Ct$ : Diferencia entre los valores de Ct de la muestra y el control, para el gen de interés o para el *housekeeping*.

### **Análisis de datos**

Los resultados se expresaron utilizando la media  $\pm$  error estándar (SEM) de los resultados obtenidos en al menos 3 experimentos. Los geles y fotos mostrados se obtuvieron de experimentos representativos. El análisis estadístico utilizado fue el Mann-Whitney cuando se compararon 2 grupos experimentales y ANOVA o Kruskal Wallis, cuando se compararon 3 o más grupos. Si las diferencias halladas por ANOVA resultaron significativas, se realizó el post test Bonferroni mientras que para el Kruskal Wallis se usó el test de Dunn. Valores de  $p < 0,05$  se consideraron significativos. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism 5.

# RESULTADOS

## 1. EXPRESIÓN DE FMRP DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR DE RATA

### 1.1. Análisis de la expresión de FMRP en los diferentes tipos celulares de ovario mediante inmunohistoquímica

El primer objetivo de nuestro trabajo fue abordado, en una primera etapa, analizando mediante inmunohistoquímica la expresión de la proteína FMRP en cortes de ovario provenientes de tres grupos diferentes de ratas en las cuales se estimuló o no el crecimiento folicular. Como se detalló en Materiales y Métodos (pág. 49), los estudios se realizaron con ratas de 18-23 días de edad, antes de que empezaran a ciclar y siendo, por lo tanto, ratas en un estadio prepuberal del desarrollo.

El primer grupo fue de ratas sin tratamiento. En estas condiciones al momento del sacrificio, sus ovarios contenían mayoritariamente folículos preantrales (FPA). Estas ratas serán nombradas a partir de ahora como ratas prepuberales. Las ratas de los dos grupos restantes fueron tratadas con DES o con PMSG. En el caso de las ratas tratadas con DES, el tratamiento sincroniza el desarrollo folicular y promueve el enriquecimiento del ovario en folículos antrales tempranos (FAT), mientras que en las tratadas con PMSG, se promueve el enriquecimiento en folículos preovulatorios (FPO) (Li *et al.* 1998).

Los folículos de rata en diferentes estadios del desarrollo pueden distinguirse según sus características morfológicas tales como el tamaño y el número de capas de células de granulosa (CG). Los FPA presentan un ovocito rodeado de entre dos y cuatro capas de CG y tienen un diámetro de 120-200  $\mu\text{m}$ . Los FAT presentan una pequeña cavidad antral, un diámetro de 300-400  $\mu\text{m}$  y ya se puede distinguir en ellos una fina capa de células de la teca (CT). Los FPO tienen un diámetro mayor a 450  $\mu\text{m}$ , una gruesa capa de CT y el ovocito se desplaza y se vuelve acéntrico debido al crecimiento del antro (Hirshfield & Midgley 1978).

Los resultados obtenidos, mediante inmunohistoquímica, de la expresión de FMRP durante el desarrollo folicular, se muestran en la *figura 10*.

Como se observa, en ratas prepuberales sin tratar la tinción para FMRP se detectó en CG y CT así como en el estroma del ovario, aunque no se observaron diferencias en la intensidad de la tinción en los diferentes tipos celulares (*fig. 10A*). Asimismo, el citoplasma de los ovocitos de folículos primordiales presentó una marca intensa para la proteína (*fig. 10G*) aunque no se observó marca en la corteza del ovario.

En los ovarios de ratas tratadas con DES y con PMSG se detectó una fuerte marca tanto en CG como en CT, así como en las pocas células estromales que se observan en ovarios que contienen FAT y FPO (*fig. 10C y 10E*).

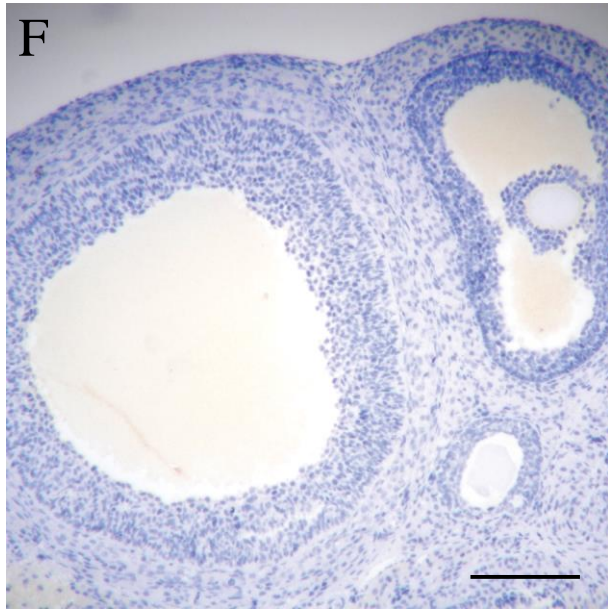
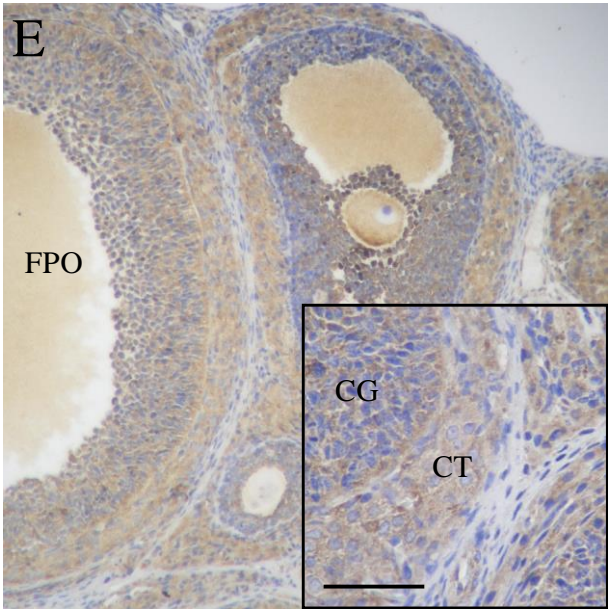
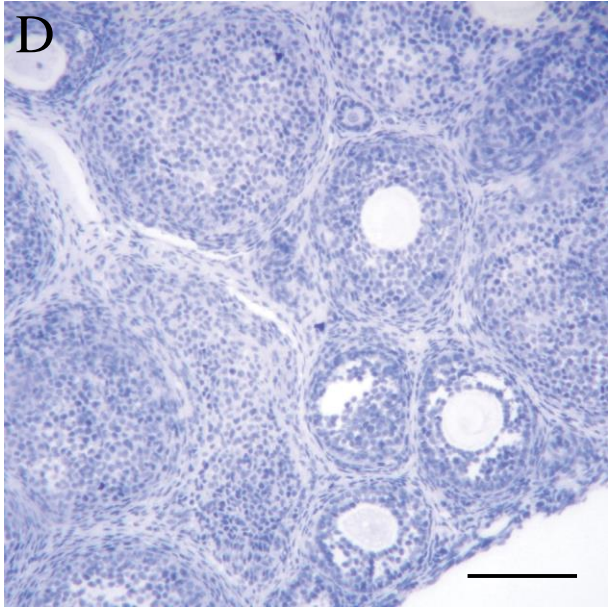
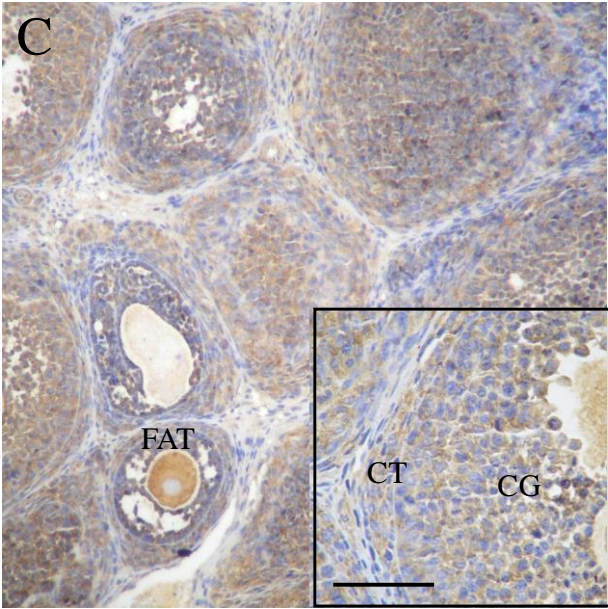
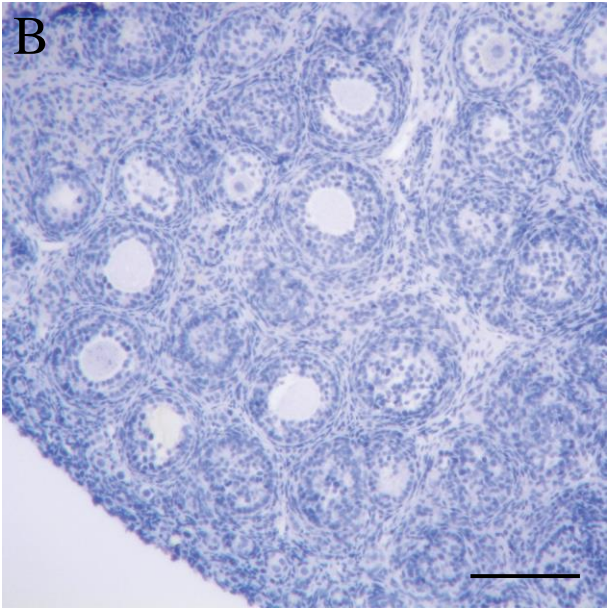
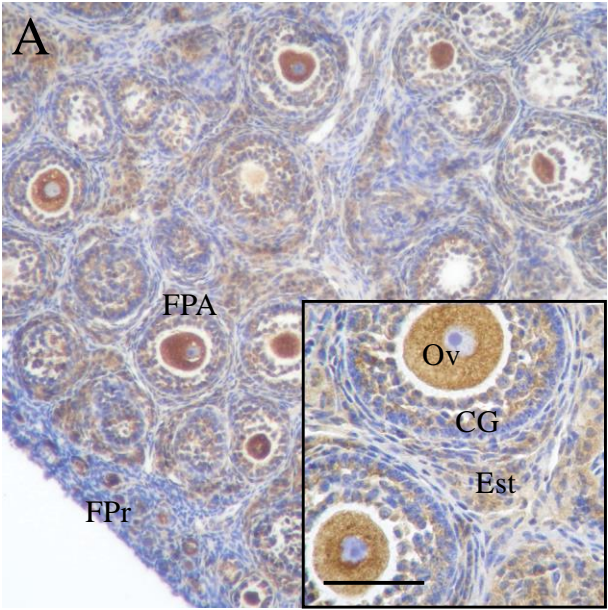
En los ovarios en los 3 estadios de la foliculogénesis no se detectó marca en un grupo de células estromales que rodean a los folículos. Muy probablemente estas células correspondan a la red vascular del ovario (*fig. 10A, 10C y 10E*).

Como puede observarse en la *figura 10I*, en folículos atrésicos detectamos una menor cantidad de células que expresaban la proteína. A su vez, se detectó marca en el ovocito en todos los estadios estudiados.

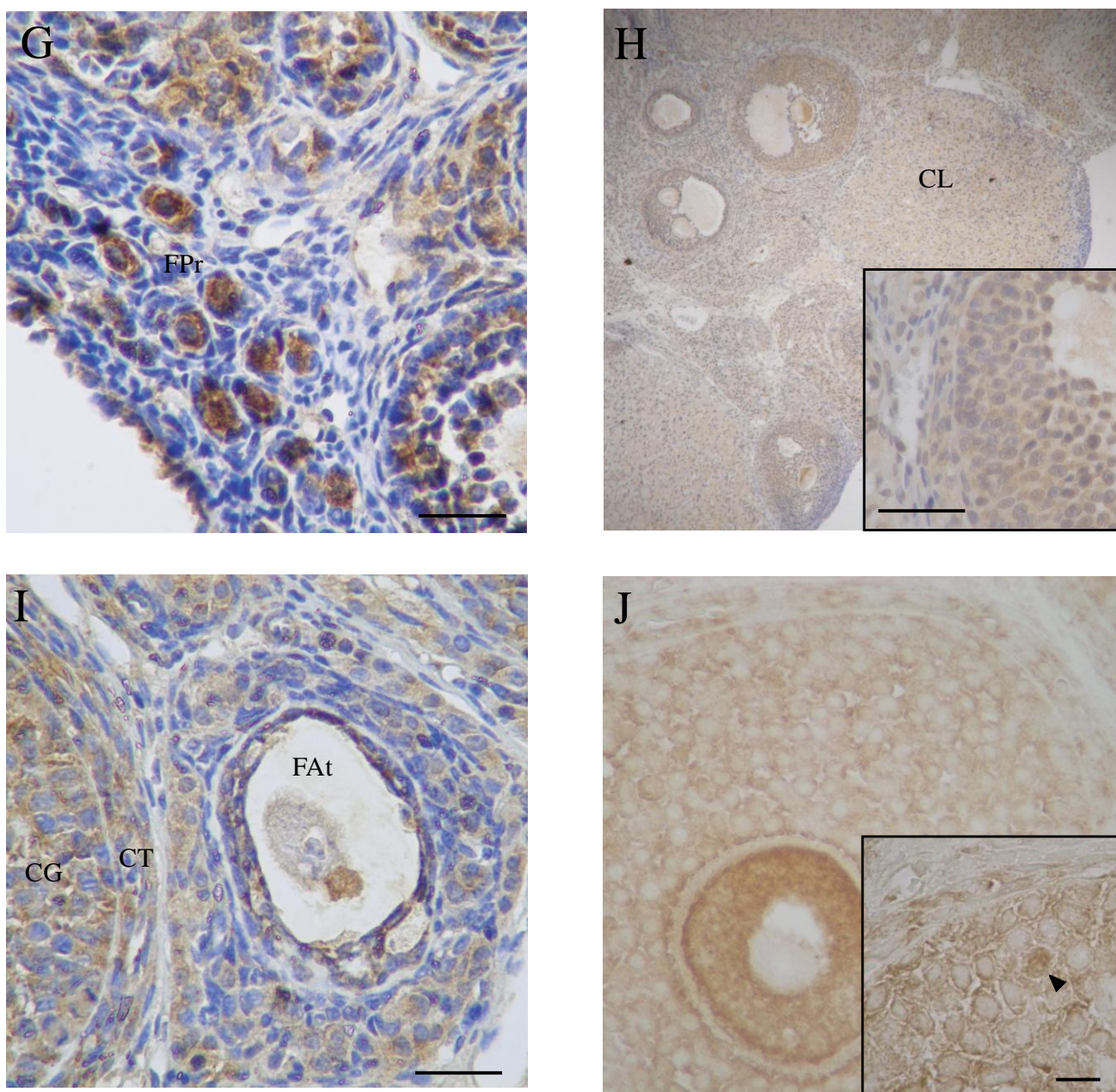
Si bien no se puede apreciar en las secciones de ovario representadas en la *figura 10*, es interesante destacar que el patrón de expresión de FMRP fue similar cuando se analizó el mismo tipo de folículo en las ratas con los distintos tratamientos. Por otro lado, el patrón de expresión fue similar al analizar secciones provenientes de ratas adultas pospuberales de 60 días sin tratamiento (*fig. 10H*). En estas ratas adultas, se observó además que la proteína FMRP se expresaba en los cuerpos lúteos (*fig. 10H*).

Como ya se mencionó en la introducción de esta tesis, la secuencia aminoacídica de la proteína posee una señal de localización nuclear. A los efectos de evidenciar su posible presencia en el núcleo, en algunas de las secciones de tejido analizadas se omitió la contra-tinción con hematoxilina. Como se observa, sólo una pequeña fracción de células presentó reacción positiva para el anticuerpo (*fig. 10J*).









**Figura 10. Microfotografías representativas de los resultados de la inmunohistoquímica para FMRP durante el desarrollo folicular en ovario de rata.** (A) Ratas prepuberales sin tratamiento. (C) Ratas prepuberales tratadas con DES. (E) Ratas prepuberales tratadas con PMSG. (B, D y F) Controles negativos sin el primer anticuerpo 1C3 (B, ratas prepuberales; D, ratas DES; F, ratas PMSG). (G) Folículos primordiales de ratas prepuberales sin tratamiento. (H) Ratas pospuberales (adultas de 60 días) sin tratamiento. (I) Folículo atrésico de ratas DES. (J) Folículos de ratas DES sin contra- tinción con hematoxilina (la flecha muestra un núcleo teñido). FPA: folículo preantral; FPr: folículo primordial; Ov: ovocito; CG: células de granulosa; CT: células de la teca; Est: estroma; FAT: folículo antral temprano; FPO: folículo preovulatorio; CL: células luteales; FAt: folículo atrésico. Los recuadros en las microfotografías representan secciones con mayor magnificación. La barras de escala representan (A, C, E, G, I y H) 50  $\mu$ m; (B, D y F) 10  $\mu$ m; (J) 20  $\mu$ m.



## 1.2. Análisis de la expresión de FMRP en folículos en distintos estadios de la foliculogénesis mediante Western-blot

Para estudiar si la expresión de FMRP variaba a lo largo de la foliculogénesis en la rata, se realizaron Western- blot de folículos preantrales, antrales tempranos y preovulatorios aislados de ovarios de ratas prepuberales, ratas DES y ratas PMSG, respectivamente, como se describió previamente. En la *figura 11* se muestran geles representativos de los resultados obtenidos.

La presencia de la proteína se estudió inicialmente en dos fracciones celulares: en el sobrenadante resultante de la primera centrifugación a 16000 x g que contiene vesículas, organelas y citosol, y en el pellet de la segunda centrifugación a 150000 x g, fracción que estaría enriquecida con ribosomas donde se esperaba que la proteína se encontrara localizada mayoritariamente (Feng *et al.* 1997).

Como se observa en la *figura 11A*, prácticamente no se detectó la presencia de la proteína en el sobrenadante de 16000 x g, a diferencia de lo que se observó en el pellet enriquecido con ribosomas. A partir de estos resultados preliminares, los experimentos subsiguientes se realizaron utilizando el pellet obtenido de la centrifugación a 150000 x g.

En la *figura 11B* se observa que la expresión de FMRP fue menor al analizar FPA y que la misma aumentó progresivamente en los FAT y los FPO. Si bien las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas, existe una clara tendencia hacia un aumento en la expresión a medida que el folículo se desarrolla.

Asimismo, y como se muestra en la figura, se detectaron cuatro isoformas de la proteína; la expresión de todas ellas aumentó a lo largo de la foliculogénesis. Los pesos moleculares de las cuatro isoformas, estimados según su distancia de migración en el gel, fueron de 65, 68, 74 y 79 kDa. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la mayoría de las isoformas esperadas de FMRP tienen pesos moleculares similares. Por lo tanto, no podemos descartar la posibilidad de que existan más isoformas de la proteína que se expresen durante la foliculogénesis y que no se puedan discriminar en un gel de poliacrilamida. Por otro lado, cuando la expresión de FMRP se

relativizó a la expresión de la proteína ribosomal S6, se observaron las mismas diferencias a lo largo de la folículogénesis (*fig. 11G*) y por lo tanto se descartaría un aumento generalizado de proteínas ribosomales durante el desarrollo folicular.

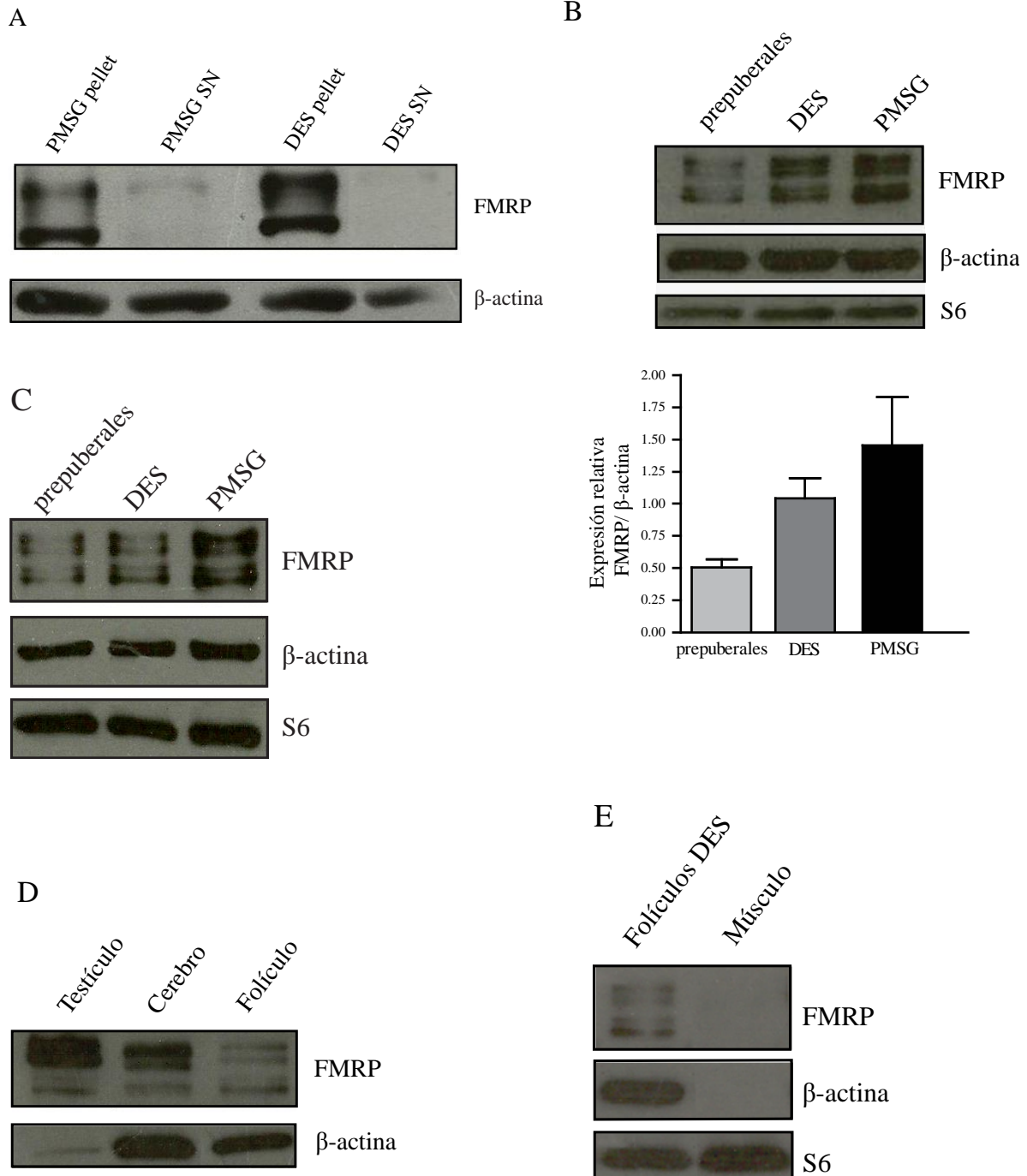
La expresión de FMRP se analizó también en el ovario entero. Los resultados obtenidos revelaron el mismo patrón de expresión, siendo menor la expresión en ovarios de ratas prepuberales sin tratar y mayor en ovarios de ratas tratadas con DES y con PMSG (*fig. 11C*).

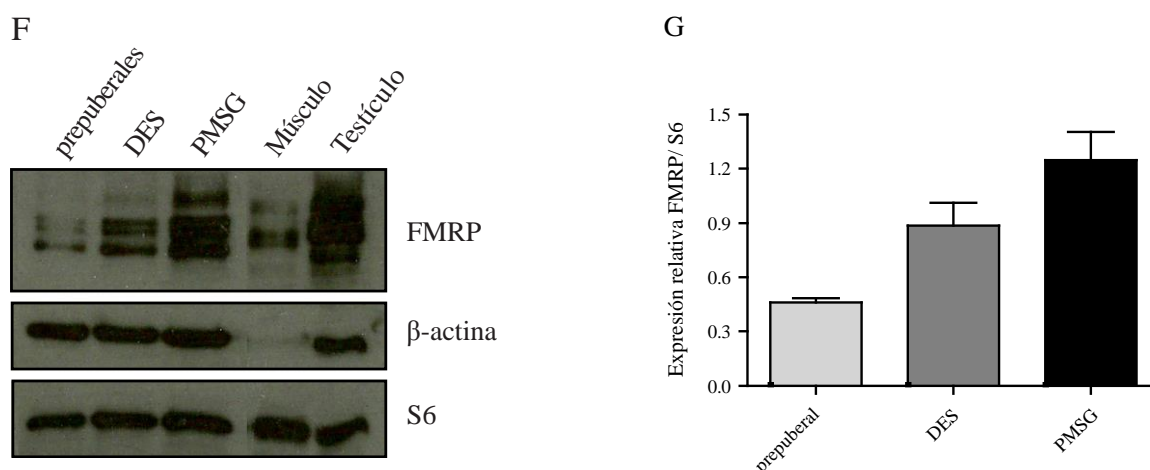
A los efectos de comparar la expresión de FMRP en el ovario con otros tejidos, se incluyó en el estudio el análisis por Western- blot de la expresión de la proteína en testículo y cerebro de rata, tejidos en los cuales se ha documentado una alta expresión de FMRP (Devys *et al.* 1993, Tamanini *et al.* 1997, Bakker *et al.* 2000), así como en músculo esquelético, tejido en el cual se reportó su ausencia (Devys *et al.* 1993, Khandjian *et al.* 1998, Bakker *et al.* 2000). Estos tejidos, por lo tanto, representaron a su vez controles positivos y negativos de la expresión de FMRP, respectivamente (*fig. 11D y 11E*).

Como se observa en la *figura 11D*, y en forma similar a lo reportado, la expresión de FMRP en testículo es elevada. Por otro lado, no se observa expresión de la proteína en el músculo (*fig. 11E*). Asimismo observamos que, si bien en el testículo y en cerebro se detectaron las mismas cuatro isoformas que en el ovario, su expresión relativa fue diferente. Los niveles de expresión de las isoformas en ovario resultaron ser equivalentes entre ellas, mientras que en testículo y cerebro fueron más abundantes las de alto peso molecular (PM) (*fig. 11D*).

A los efectos de descartar que exista una expresión leve en tejido muscular que no se hubiera detectado con los tiempos de exposición utilizados, uno de las membranas de Western- blot se reveló a mayores tiempos de exposición. Como se observa en la *figura 11F*, al aumentar el tiempo de exposición (entre 2 y 3 minutos), se detectaron bandas en el tejido muscular aunque el patrón difirió al observado en el resto de los tejidos estudiados (folículos, cerebro y testículo). Estas bandas podrían corresponder a la proteína homóloga de FMRP, la FXR1P (ubicada en el cromosoma 2 en rata y 3 en humano) y que se reportó se expresa en forma abundante en músculo

esquelético (Khandjian *et al.* 1998, Bakker *et al.* 2000). Si bien el anticuerpo utilizado contra FMRP es monoclonal, se describió que el mismo puede presentar reacción cruzada en caso de una expresión muy alta de FXR1P.





**Figura 11. Análisis de la expresión de FMRP.** (A) Expresión de FMRP en el sobrenadante (SN) de la primera centrifugación y en el pellet obtenido de la segunda centrifugación. (B, panel superior) Expresión en FPA de ratas prepuberales (prepuberales), en FAT de ratas DES (DES) y en FPO de ratas PMSG (PMSG). (B, panel inferior) Cuantificación de la expresión de FMRP en folículos. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M normalizado a la expresión de  $\beta$ -actina en tres extractos diferentes.  $p > 0,05$  (C) Expresión en ovarios de ratas prepuberales (prepuberales), de ratas DES (DES) y de ratas PMSG (PMSG). (D) Expresión de FMRP en testículos, cerebro y FPO de rata. (E) Expresión de FMRP en FAT y músculo de rata. (F) Expresión en ovarios de ratas prepuberales, ratas DES, ratas PMSG, músculo y testículo. Se muestra una placa muy expuesta. (G) Cuantificación de la expresión de FMRP en ovarios. Los valores se relativizaron a la expresión de la proteína S6 en 2 extractos diferentes. En todos los casos se sembraron 12  $\mu$ g de proteína excepto para testículo en la figura D, donde se sembraron 5 $\mu$ g. Se muestran geles representativos.

## 2. EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO DE *FMR1* DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR DE RATA

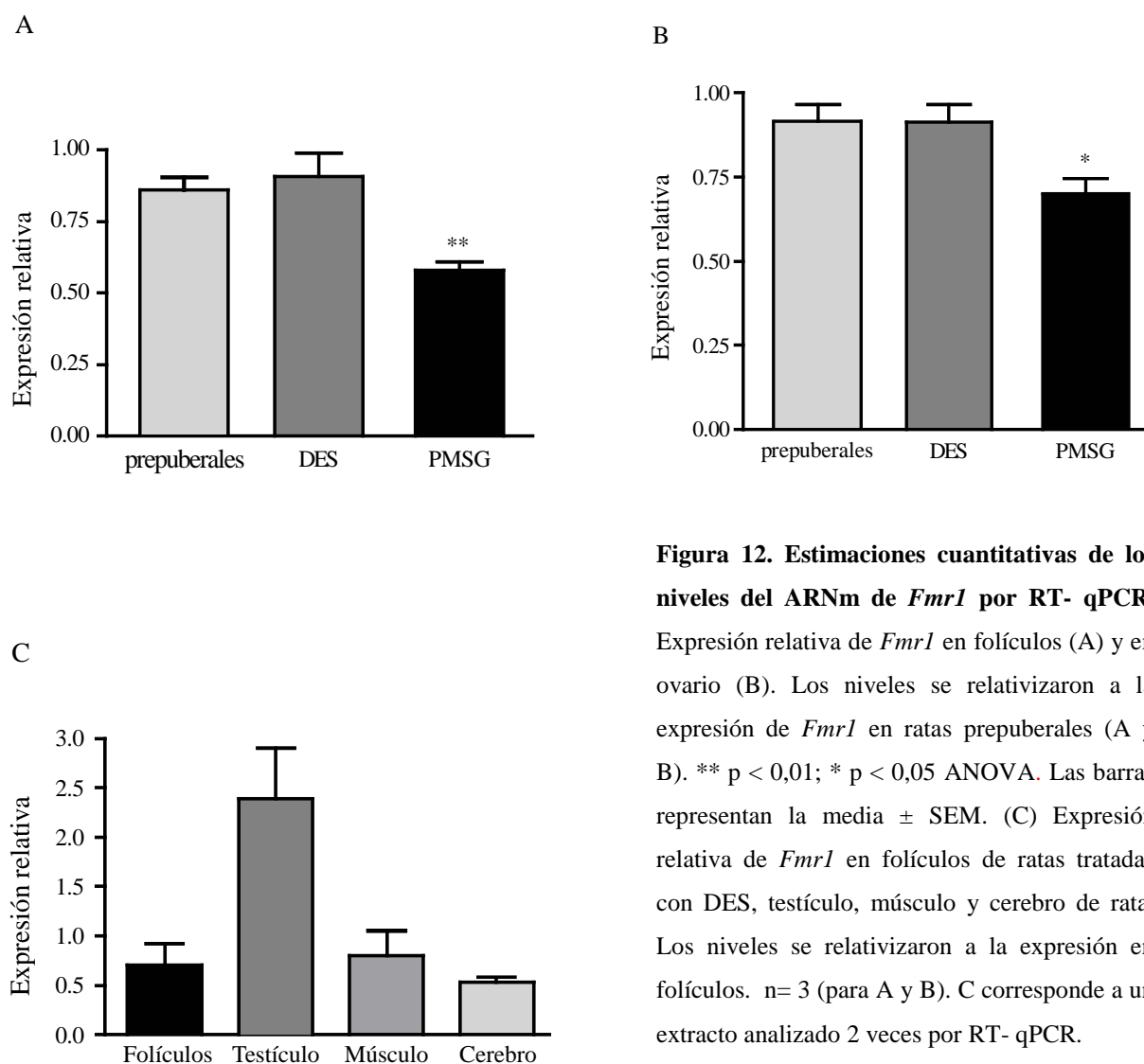
Con el objetivo de estudiar si los cambios en los niveles de proteína a lo largo de la foliculogénesis se correlacionaban con variaciones en el ARNm, cuantificamos los niveles de ARNm de *Fmr1* por PCR en tiempo real (RT- qPCR) utilizando el par de cebadores descritos en la *tabla 1* de la sección Materiales y Métodos. Estos cebadores amplifican una zona del ARNm de *Fmr1* en la cual no se describieron eventos de *splicing* y por lo tanto los resultados obtenidos corresponderían a todas las posibles isoformas de *Fmr1* que se transcriben.

En la *figura 12* se muestran los resultados de los niveles relativos de expresión del ARNm de *Fmr1* medidos por RT- qPCR.

Durante la puesta a punto de las condiciones de RT-qPCR se utilizó inicialmente el gen 18S como *housekeeping*. Sin embargo, los resultados obtenidos con este gen fueron inconsistentes ya que mostraba expresión aun en ausencia del ADNc. Es posible que esta expresión se deba en realidad a que este gen presenta un número elevado de copias en el genoma (Srivastava & Schlessinger 1991) y por lo tanto, y a pesar de que se realizó el tratamiento con DNAsa de las preparaciones, pequeñas cantidades de ADN genómico contaminante podrían resultar en una amplificación del mismo durante la RT- qPCR. Por lo tanto, como gen *houeskeeping* contra el cual se relativizaron los resultados de la expresión de *Fmr1*, se utilizó el gen *HPRT*. La elección de este gen se basó en que el mismo es de copia única además de que se encuentra ubicado también en el cromosoma X. Si bien en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, [www.ncbi.gov.ar](http://www.ncbi.gov.ar)) la secuencia amplificada por el set de cebadores tiene una identidad de secuencia del 96% con un pseudogen de HPRT procesado, el cebador antisentido utilizado no se aparearía con este pseudogen (ver apéndice).

Llamativamente y como se puede observar en la *figura 12*, el patrón de expresión del ARNm de *Fmr1* resultó inverso al observado para proteínas. Se detectaron menores cantidades de ARNm en las ratas tratadas con PMSG tanto en folículos aislados (*fig. 12A*) como en el ovario entero (*fig. 12B*), respecto de los otros dos grupos de ratas con ovarios enriquecidos con folículos preantrales y antrales tempranos. En este caso, las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas.

La expresión del mensajero *Fmr1* se analizó también en los tejidos en los cuales se halló presencia o ausencia de la proteína, según se consignó precedentemente. En el caso de la expresión en ovario, se tomaron folículos de ratas tratadas con DES. Como se observa en la *figura 12C*, se detectó una clara tendencia hacia una mayor expresión del ARNm en testículos mientras que los niveles en músculo, cerebro y folículos ováricos fueron similares entre sí. Como se observa, detectamos expresión del ARNm en músculo, a diferencia de lo hallado a nivel proteico.



**Figura 12. Estimaciones cuantitativas de los niveles del ARNm de *Fmr1* por RT- qPCR.**

Expresión relativa de *Fmr1* en folículos (A) y en ovario (B). Los niveles se relativizaron a la expresión de *Fmr1* en ratas prepuberales (A y B). \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  ANOVA. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. (C) Expresión relativa de *Fmr1* en folículos de ratas tratadas con DES, testículo, músculo y cerebro de rata. Los niveles se relativizaron a la expresión en folículos.  $n = 3$  (para A y B). C corresponde a un extracto analizado 2 veces por RT- qPCR.

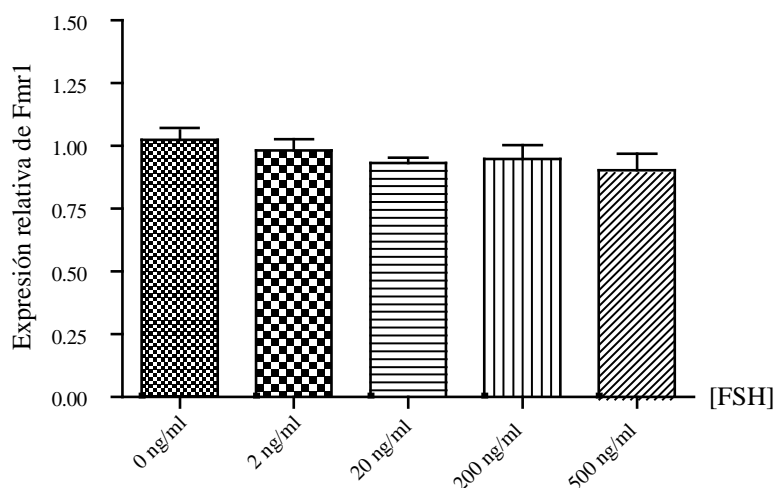
### 3. POSIBLE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *FMRI* EN FOLÍCULOS ANTRALES TEMPRANOS POR FSH

Teniendo en cuenta los resultados anteriores en los que se observaron diferencias en la expresión, tanto de la proteína como de su ARNm, y dado que nada se sabe acerca de la regulación de su expresión en el ovario y en particular se desconoce si la misma puede estar regulada por hormonas, quisimos evaluar si la FSH, la hormona trófica por excelencia, podría estar modulando dicha expresión. Para tal fin, se cultivaron folículos provenientes de ratas DES en condiciones basales (sin FSH) o con concentraciones crecientes de la hormona, como se describió en la

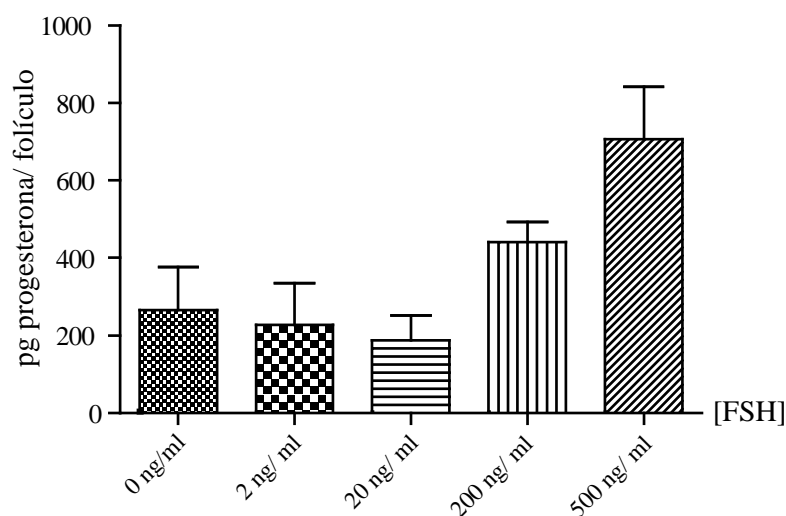
sección de Materiales y Métodos (pág. 51) y se midió la expresión del mensajero por RT-qPCR. Para este estudio se eligieron folículos en el estadio antral temprano ya que los mismos dependen en gran medida de la FSH para su progreso y maduración, por lo cual son muy sensibles a la acción de esta hormona (McGee & Hsueh 2000).

Los resultados obtenidos se muestran en la *figura 13*. Como se observa, no existirían diferencias significativas en la expresión del ARNm de *Fmr1* en FAT cultivados con distintas concentraciones de FSH.

En paralelo, como control de que los folículos respondían a la acción de FSH, medimos la progesterona secretada en el medio de cultivo. Aunque los niveles hallados en nuestros experimentos no muestran diferencias estadísticamente significativas, hay una clara tendencia hacia un aumento en la cantidad de progesterona/folículo frente concentraciones crecientes de FSH (*fig. 14*).



**Figura 13.** Estimaciones cuantitativas de los niveles del ARNm de *Fmr1* por RT- qPCR en FAT. Niveles de *Fmr1* en folículos en cultivo con concentraciones crecientes de FSH (ng/ml). Los valores se relativizaron a la expresión de *Fmr1* en condiciones basales (0 ng/ml). Las barras representan la media  $\pm$  SEM de 2 experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado.  $p > 0,05$  (Test de Kruskal- Wallis).



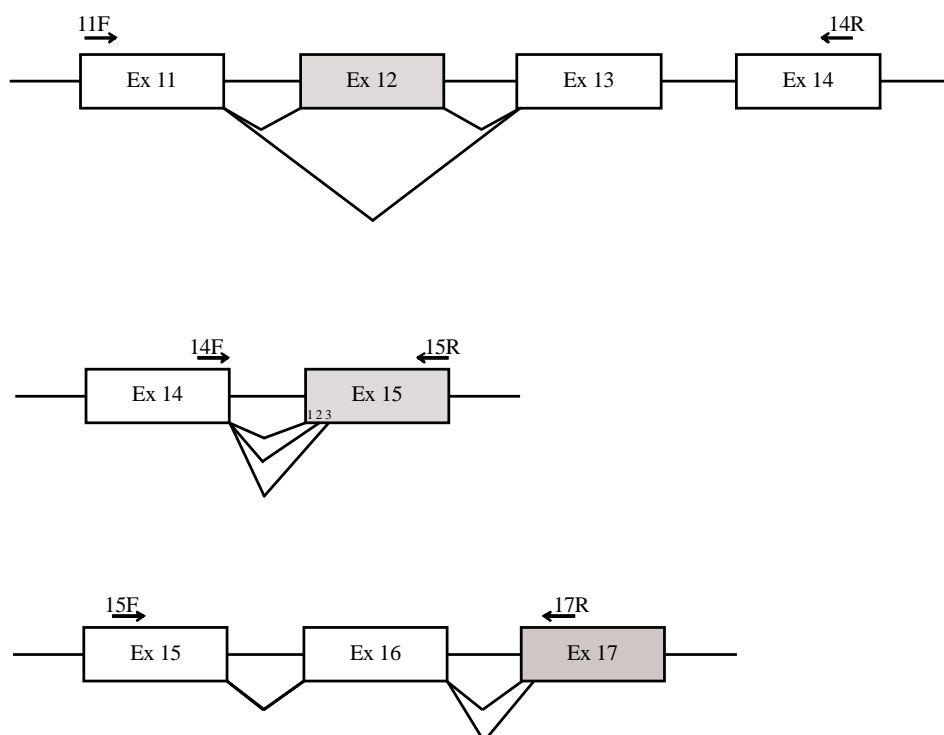
**Figura 14. Niveles de progesterona en el medio de cultivo.** Se midieron los niveles de progesterona en el medio condicionado por la técnica de RIA. Los valores se expresaron como pg de progesterona/folículo. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de 2 experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado.  $p > 0,05$  (Test de Kruskal-Wallis).

#### 4. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE ISOFORMAS DE *FMRI* EN FOLÍCULOS AISLADOS Y OVARIOS DE RATA

##### 4.1. Estudio por RT-PCR

Se ha sugerido que el gen *FMRI* puede, por *splicing* alternativo, generar hasta 20 isoformas diferentes de ARNm maduro (Eichler *et al.* 1993). Los exones en los cuales se ha descrito o sugerido que ocurren mayoritariamente eventos de *splicing* alternativo son los exones 12, 14, 15 y 17 (Ashley *et al.* 1993, Eichler *et al.* 1993, Verkerk *et al.* 1993, Xie *et al.* 2009). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos analizar las isoformas que se expresan tanto en los diferentes tipos de folículos como en el ovario entero en el modelo de rata utilizado. Para tal fin, se utilizaron 3 pares de cebadores diseñados para detectar las posibles isoformas de *splicing* en los exones mencionados (sets de cebadores I, II y III descritos en la *tabla 1*, sección Materiales y Métodos, pág. 57) y a modo comparativo se analizó también la expresión en testículo, cerebro y músculo de rata. En la *figura 15* se muestra un esquema de los exones estudiados del gen *Fmr1* y la ubicación de los sets de cebadores utilizados.





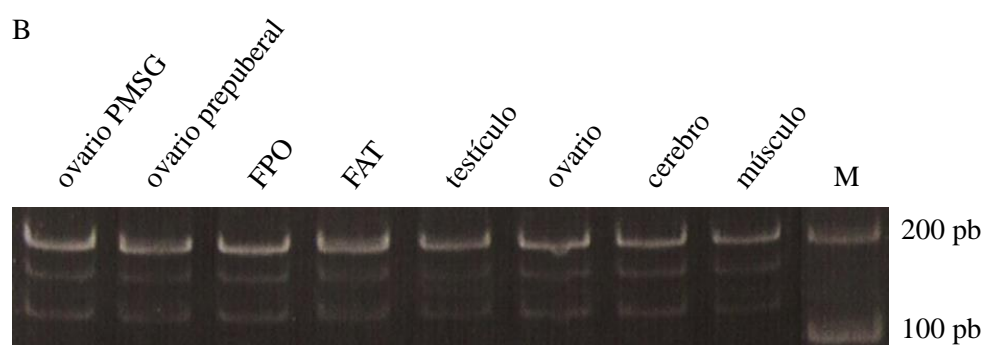
**Figura 15. Esquema de los exones amplificados por PCR.** Se utilizaron los sets de cebadores descritos en la figura para la amplificación por PCR de las posibles isoformas del gen. Los números 1, 2 y 3 en el exón 15, señalan los 3 sitios de *splicing* alternativo propuestos para este exón (1: isoforma I; 2: isoforma II; 3: isoforma III). Los exones en gris son aquellos en los que se ha descrito *splicing* alternativo.

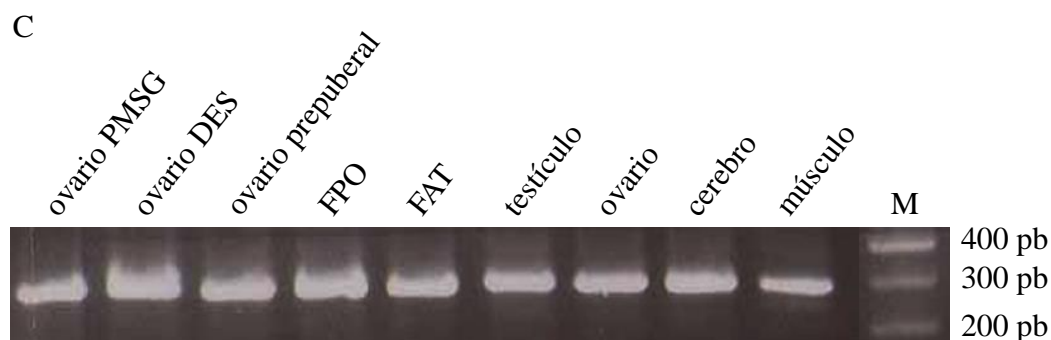
El análisis realizado con el set I de cebadores (11F+ 14R) arrojó como resultado la presencia de 3 fragmentos de amplificación (*figura 16A*). Dos de esos fragmentos poseían un PM esperado de 407 pb y 344 pb acorde con la presencia o ausencia del exón 12, respectivamente. Los estudios posteriores de secuenciación (ver más adelante) demostraron que efectivamente, sólo dos de los fragmentos resultaron específicos, y que el fragmento de mayor PM era inespecífico. La presencia de un fragmento inespecífico similar fue descrito con anterioridad por Xie y col. (Xie *et al.* 2009). El patrón de bandas obtenido con este set de cebadores fue similar al que se observó al analizar el ovario de ratas tratadas con PMSG, tratadas con DES y ratas prepuberales, y en folículos preovulatorios y antrales tempranos. Si bien la RT-PCR realizada no es cuantitativa, en todos estos casos observamos una mayor expresión de la isoforma de menor peso molecular, que

por su movilidad en el gel correspondería a la isoforma sin el exón 12. Estos resultados fueron similares a los obtenidos al analizar el ovario de rata adulta sin tratar, cerebro y tejido muscular. El único tejido que mostró un patrón de expresión diferente fue el testículo, en el cual las dos isoformas se expresarían en cantidades similares (*figura 16A*).

El análisis con el set II (14F+ 15R) reveló la presencia de 3 fragmentos de amplificación, cuyos pesos moleculares eran los esperados si se utilizaran los 3 sitios aceptores de *splicing* alternativo descritos del exón 15: fragmento I 203 pb, fragmento II 168 pb y fragmento III 129 pb (*fig. 16B*). En todos los tejidos analizados fue mayoritaria la banda de mayor peso molecular que correspondería a la isoforma que utiliza el primer sitio aceptor de *splicing*.

Por último, el set III de cebadores (15F+ 17R), amplificó una única banda de 300 pb en todos los tejidos estudiados, indicando que, al menos en los tejidos analizados, no existe *splicing* alternativo en el exón 17 (*fig. 16C*).





**Figura 16. Análisis por RT-PCR de la expresión de diferentes isoformas del ARNm de *Fmr1*.** (A) Bandas amplificadas con el set de cebadores 11F+ 14R para estudiar el *splicing* del exón 12. (B) Bandas amplificadas con el set de cebadores 14F+ 15R para estudiar el *splicing* alternativo en el exón 15. (C) Bandas amplificadas con el set de cebadores 15F+ 17R para estudiar el *splicing* alternativo del exón 17. Todos los tejidos estudiados son de rata. FPO: folículos preovulatorios; FAT: folículos antrales tempranos; ovario: ovario de rata adulta sin tratar; M: marcador de peso molecular; pb: pares de bases.

#### 4.2. Secuenciación de las bandas amplificadas

Para determinar la secuencia nucleotídica de los productos de amplificación obtenidos con los distintos sets de cebadores, los productos se secuenciaron tanto en orientación sentido como antisentido a partir de las bandas obtenidas y purificadas del gel de agarosa o de poliacrilamida, o bien *a posteriori* de su clonado, según se detalló en la sección Materiales y Métodos (pág. 58). En los casos en que fue necesario, se consideraron las lecturas obtenidas por ambas estrategias para obtener la secuencia completa de la isoforma. En el caso específico de la isoforma III del exón 15 de ovario de rata, la PCR y la posterior secuenciación se realizó con el par de cebadores 14F+ 17R para obtener un fragmento más largo.

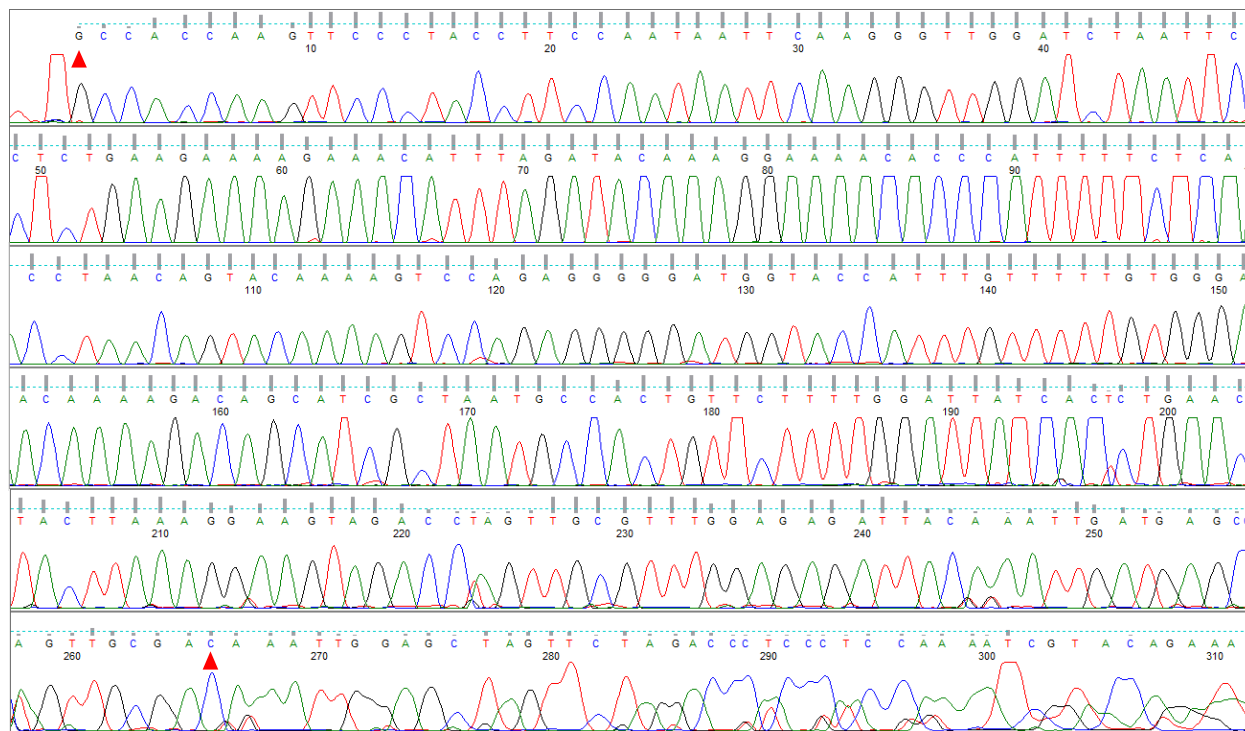
En la *figura 17* se muestran los electroferogramas obtenidos para las distintas isoformas y el resultado del alineamiento de las mismas con las secuencias nucleotídicas de rata, utilizando la base de datos NCBI. Cabe destacar, sin embargo, que las secuencias del ARNm de *Fmr1* que se encuentran en la base de datos provienen de mensajeros del cerebro o de tumor de glándula adrenal. No se han descrito previamente las isoformas en testículo ni en ovario de rata. En este

contexto, por lo tanto, se secuenciaron los fragmentos obtenidos a partir del ARNm de ovario utilizando los 3 sets de cebadores, así como los obtenidos a partir de testículo con los pares I y III. Como se mencionó anteriormente, la secuenciación de los fragmentos amplificados con los cebadores 11F+ 14R confirmó que sólo dos de ellos eran específicos. El fragmento de menor peso molecular correspondió a la isoformas sin el exón 12 (*fig. 17A*) mientras que el de mayor peso molecular, a la isoforma que contiene al exón (*fig. 17B, 17G*). Debido a que las secuencias de los mensajeros de rata que se encuentran depositadas en la base de datos no contienen el exón 12, los alineamientos en las *figuras 17B y 17G* presentan partes de la secuencia que no se alinean con ninguna secuencia registrada en dicha base.

Los tres fragmentos obtenidos por amplificación con el set 14F+ 15R se correspondieron con las isoformas esperadas resultantes del *splicing* alternativo en el exón 15 y descritas anteriormente en ratón (Xie *et al.* 2009). Sin embargo, como ya se consignara, las isoformas descritas corresponden a tejidos diferentes al ovárico. Al igual que para el exón 12, la isoforma III del exón 15 presenta una región que no se alinea con ninguna de las secuencias depositadas en la base de datos de rata.

La amplificación con los cebadores 15F+ 17R resultó en un solo fragmento correspondiente a la isoforma con la utilización del primer sitio aceptor de *splicing*, tanto en ovario como en testículo de rata (*fig. 17H*).

A. Isoforma sin exón 12. Ovario de rata. Cebador 14R



gccaccaagttccctaccttccaataattcaagggttgatctaattcctctgaagaaaagaaac  
atthagatacaaaggaaaacacccatttttctcaacctaacagtacaaaagtccagaggggggatg  
gtaccatttggttttggtggaacaaaagacagcatcgctaatgccactgttcttttgattatca  
cctgaactacttaaggaagtagaccagttgcgtttggagagattacaaattgatgagcagttgc  
gac

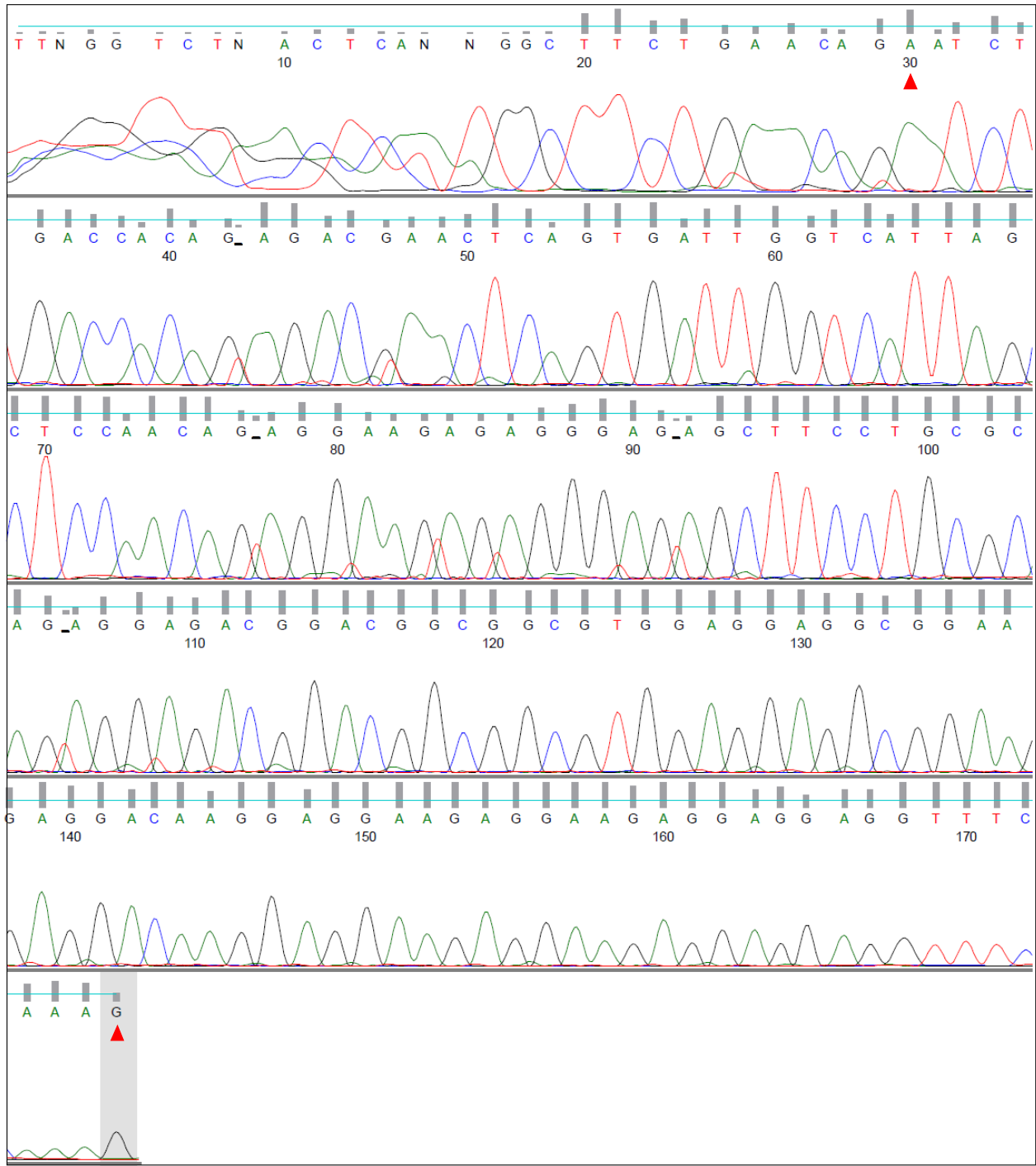
Query	1	GCCACCAAGTTCCCTACCTTCCAATAATTCAAGGGTTGGATCTAATTCCTCTGAAGAAAA	60
Sbjct	1180	GCCACCAAGTTCCCTACCTTCCAATAATTCAAGGGTTGGATCTAATTCCTCTGAAGAAAA	1239
Query	61	GAAACATTTAGATACAAAGGAAAACACCCATTTTCTCAACCTAACAGTACAAAAGTCCA	120
Sbjct	1240	GAAACATTTAGATACAAAGGAAAACACCCATTTTCTCAACCTAACAGTACAAAAGTCCA	1299
Query	121	GAGGGGGATGGTACCATTTGTTTTGTGGGAACAAAAGACAGCATCGCTAATGCCACTGT	180
Sbjct	1300	GAGGGGGATGGTACCATTTGTTTTGTGGGAACAAAAGACAGCATCGCTAATGCCACTGT	1359
Query	181	TCTTTTGGATTATCACCTGAACTACTTAAAGGAAGTAGACCAGTTGCGTTTGGAGAGATT	240
Sbjct	1360	TCTTTTGGATTATCACCTGAACTACTTAAAGGAAGTAGACCAGTTGCGTTTGGAGAGATT	1419
Query	241	ACAAATTGATGAGCAGTTGCGAC	263
Sbjct	1420	ACAAATTGATGAGCAGTTGCGAC	1442

Sbjct: Rattus norvegicus fragile X mental retardation 1 (Fmr1), mRNA

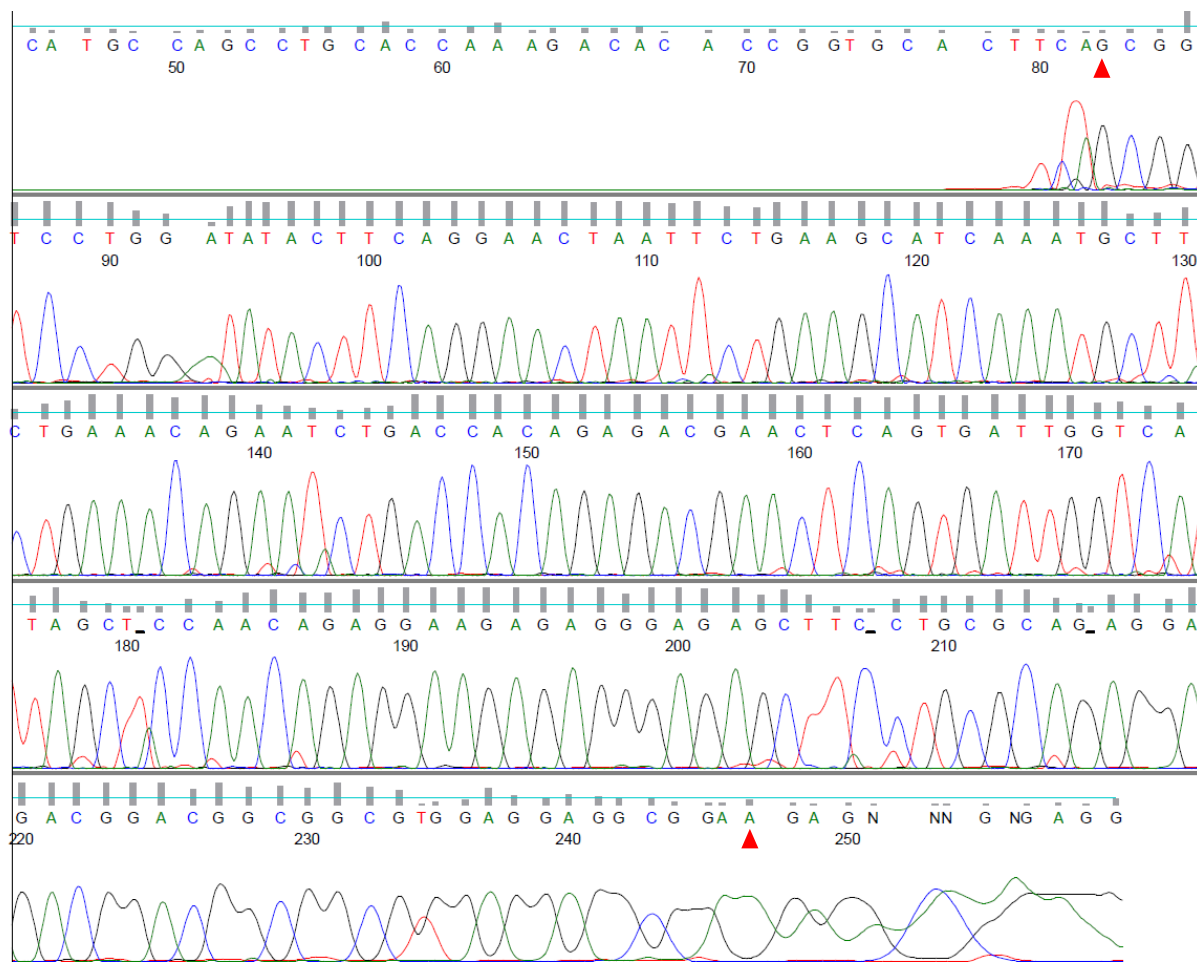


C. Isoforma I exón 15. Ovario de rata. Cebadores 14F + 15R

14F



15R



gcggtcctggatatacttcaggaactaattctgaagcatcaaatgcttctgaaacagaatctgac  
cacagagacgaactcagtgattgggtcattagctccaacagaggaagagagggagagcttcctgcg  
cagaggagacggacggcggcgtggaggaggcggaagaggacaaggaggaagaggaagaggaggag  
gtttcaaag

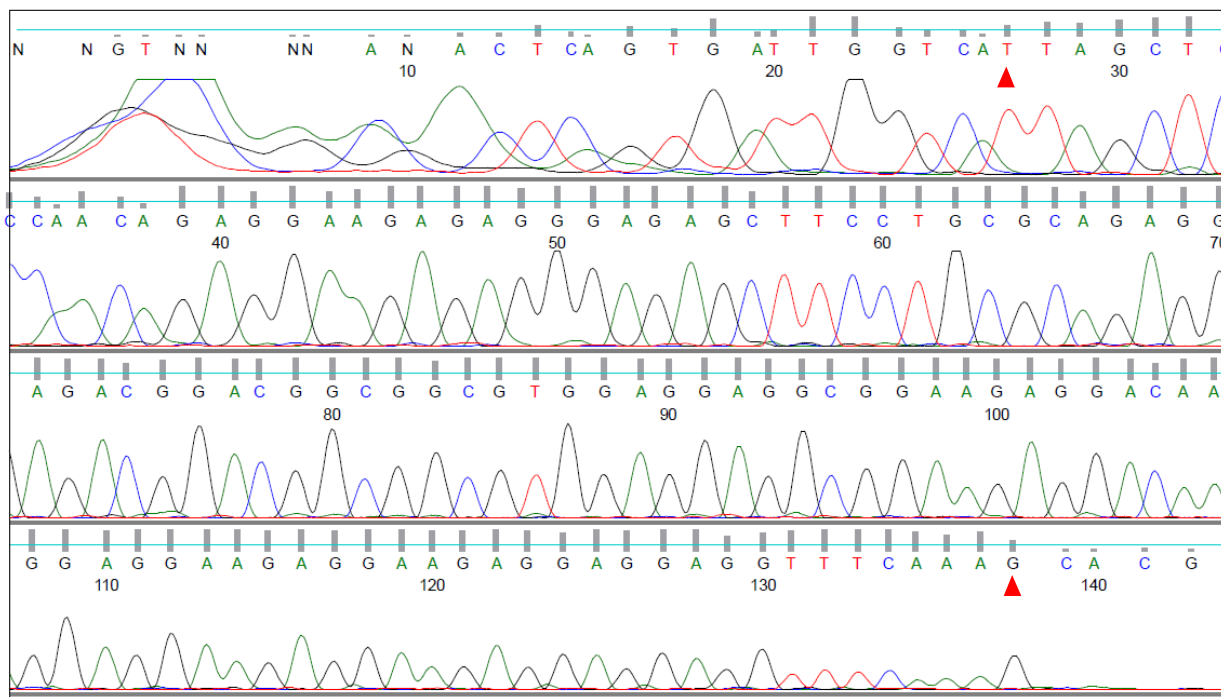
Query	1	GCGGTCCTGGATATACTTCAGGAAC TAATTCTGAAGCATCAAATGCTTCTGAAACAGAAT	60
Sbjct	1275	GCGGTCCTGGATATACTTCAGGAAC TAATTCTGAAGCATCAAATGCTTCTGAAACAGAAT	1334
Query	61	CTGACCACAGAGACGAAC TCAGTGATTGGTCATTAGCTCCAACAGAGGAAGAGAGGGAGA	120
Sbjct	1335	CTGACCACAGAGACGAAC TCAGTGATTGGTCATTAGCTCCAACAGAGGAAGAGAGGGAGA	1394
Query	121	GCTTCCTGCGCAGAGGAGACGGACGGCGCGTGGAGGAGGCGGAAGAGGACAAGGAGGAA	180
Sbjct	1395	GCTTCCTGCGCAGAGGAGACGGACGGCGCGTGGAGGAGGCGGAAGAGGACAAGGAGGAA	1454
Query	181	GAGGAAGAGGAGGAGGTTTCAAAG	204
Sbjct	1455	GAGGAAGAGGAGGAGGTTTCAAAG	1478

Sbjct: Rattus norvegicus fragile X mental retardation 1 (Fmr1), mRNA

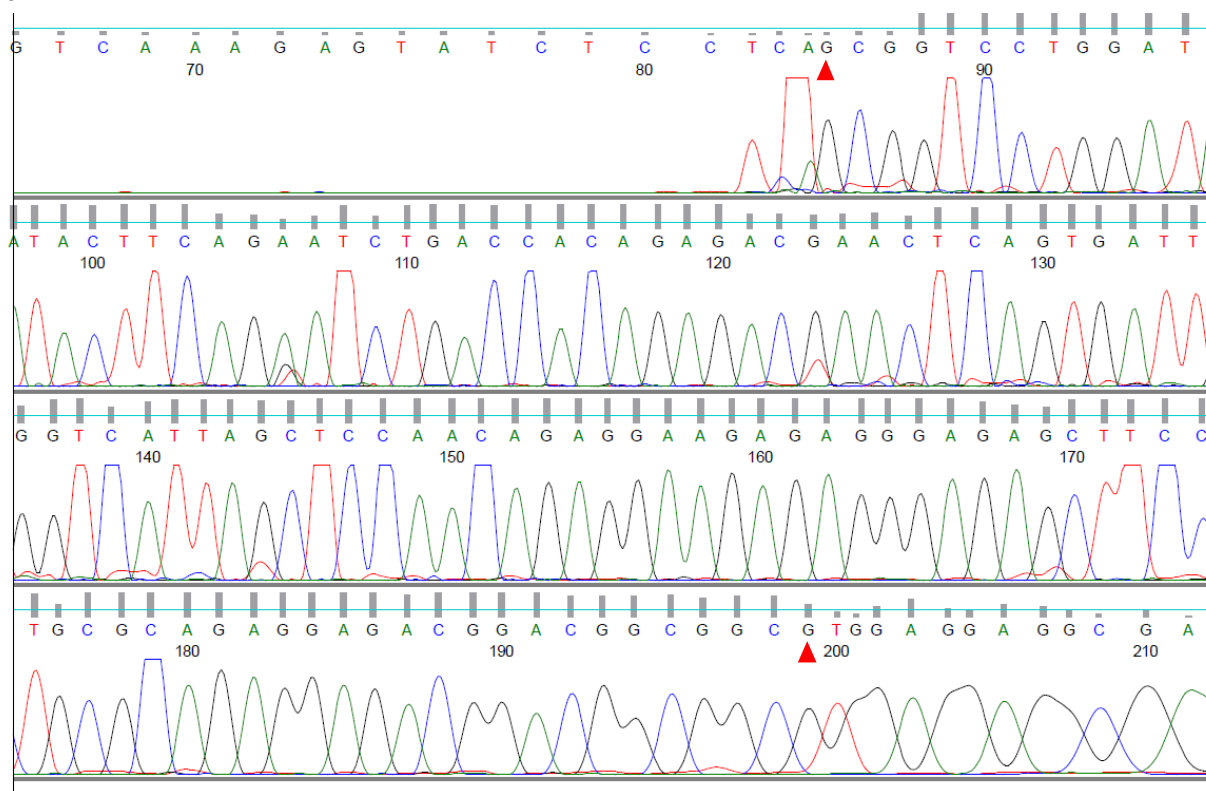


## D. Isoforma II exón 15. Ovario de rata. Cebadores 14F + 15R

14F



15R



gcggtcctggatatacttcagaatctgaccacagagacgaactcagtgattggtcattagctcca  
 acagaggaagagagggagagcttcctgcgagaggagacggacggcggcgtggaggaggcggaag  
 aggacaaggaggaagaggaagaggaggaggtttcaaag

```

Query 1      GCGGTCCTGGATATACTTCAGAATCTGACCACAGAGACGAACTCAGTGATTGGTCATTAG 60
             |||
Sbjct 1566   GCGGTCCTGGATATACTTCAGAATCTGACCACAGAGACGAACTCAGTGATTGGTCATTAG 1625

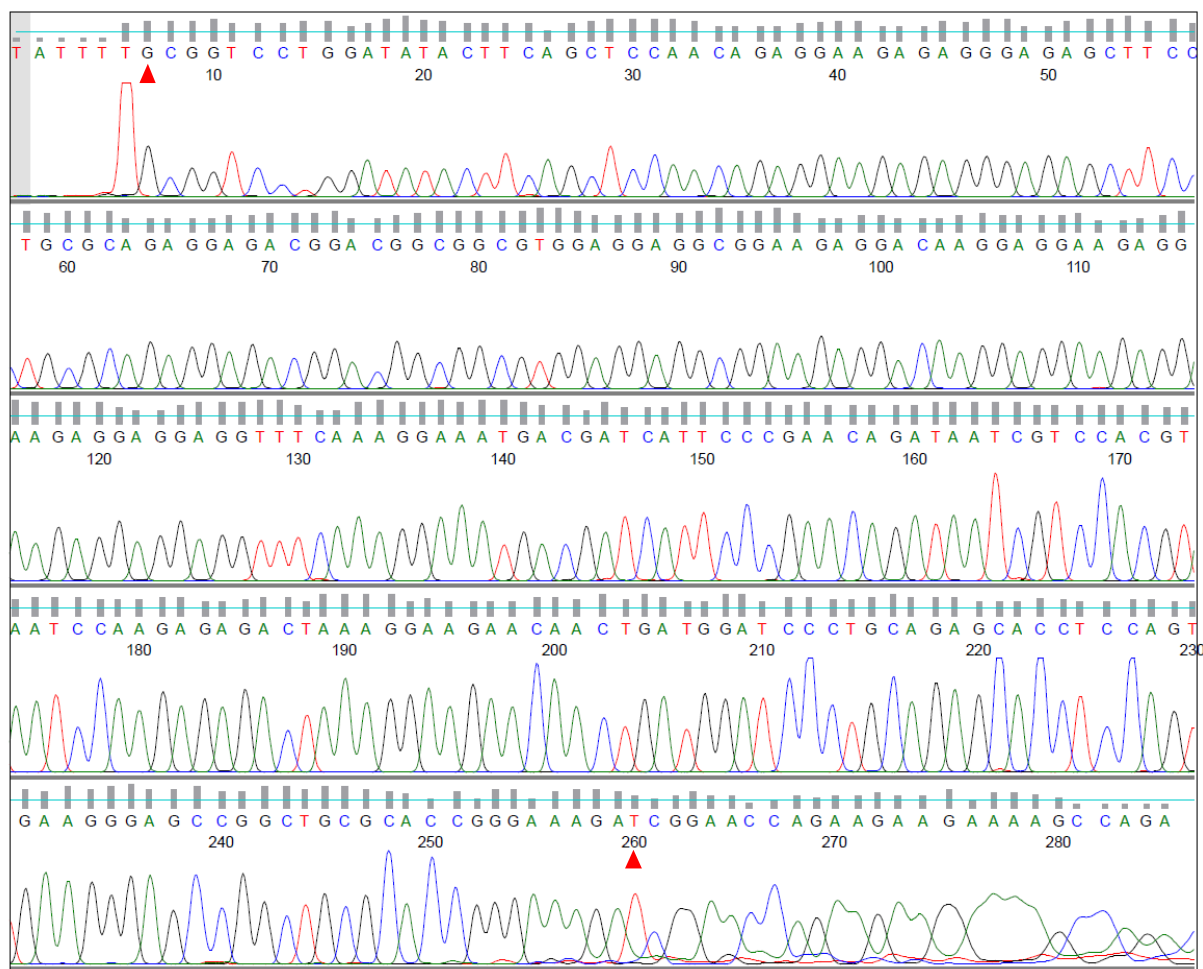
Query 61     CTCCAACAGAGGAAGAGAGGGAGAGCTTCCTGCGCAGAGGAGACGGACGGCGGCGTGGAG 120
             |||
Sbjct 1626   CTCCAACAGAGGAAGAGAGGGAGAGCTTCCTGCGCAGAGGAGACGGACGGCGGCGTGGAG 1685

Query 121    GAGGCGGAAGAGGACAAGGAGGAAGAGGAAGAGGAGGAGGTTTCAAAG 168
             |||
Sbjct 1686   GAGGCGGAAGAGGACAAGGAGGAAGAGGAAGAGGAGGAGGTTTCAAAG 1733

```

Sbjct: Rattus norvegicus fragile X mental retardation 1 (Fmr1), mRNA

#### E. Isoforma III exón 15. Ovario de rata. Cebador 17R



gcggtcctggatatacttcagctccaacagaggaagagagggagagcttcctgcgcagaggagac  
ggacggcggcgtggaggagggcggaagaggacaaggaggaagaggaagaggaggaggtttcaaagg  
aatgacgatcattcccgaacagataatcgtccacgtaatccaagagagactaaaggaagaaca  
ctgatggatccctgcagagcacctccagtgaagggagccggctgcgcaccgggaaagat

```

Query   20      AGCTCCAACAGAGGAAGAGAGGGAGAGCTTCCTGCGCAGAGGAGACGGACGGCGGCGTGG   79
        |||
Sbjct   1624    AGCTCCAACAGAGGAAGAGAGGGAGAGCTTCCTGCGCAGAGGAGACGGACGGCGGCGTGG   1683

Query   80      AGGAGGCGGAAGAGGACAAGGAGGAAGAGGAAGAGGAGGAGGTTTCAAAGGAAATGACGA   139
        |||
Sbjct   1684    AGGAGGCGGAAGAGGACAAGGAGGAAGAGGAAGAGGAGGAGGTTTCAAAGGAAATGACGA   1743

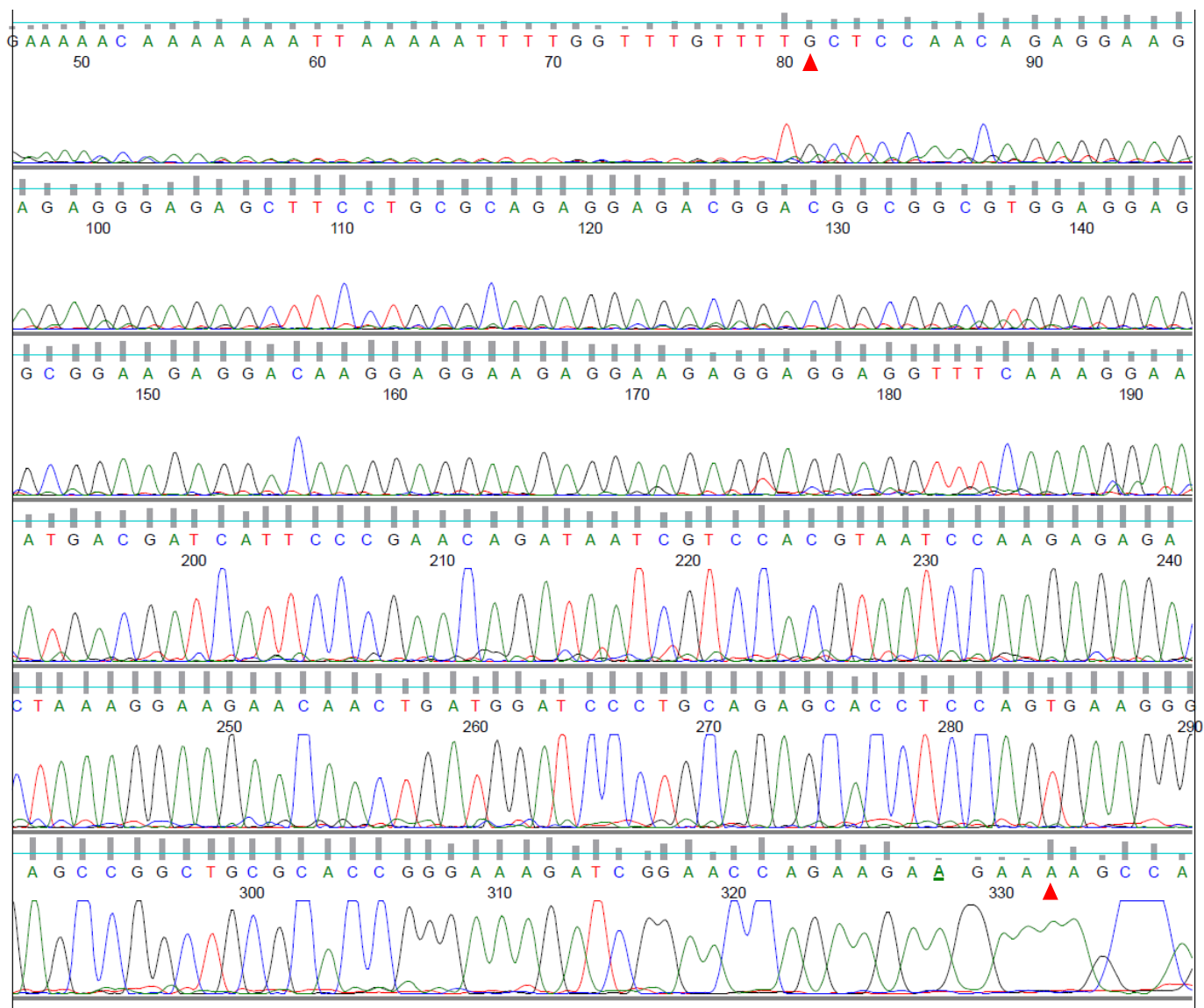
Query   140     TCATTCCCGAACAGATAATCGTCCACGTAATCCAAGAGAGACTAAAGGAAGAACAACCTGA   199
        |||
Sbjct   1744    TCATTCCCGAACAGATAATCGTCCACGTAATCCAAGAGAGACTAAAGGAAGAACAACCTGA   1803

Query   200     TGGATCCCTGCAGAGCACCTCCAGTGAAGGGAGCCGGCTGCGCACCGGGAAAGAT      254
        |||
Sbjct   1804    TGGATCCCTGCAGAGCACCTCCAGTGAAGGGAGCCGGCTGCGCACCGGGAAAGAT      1858

```

Sbjct: Rattus norvegicus fragile X mental retardation 1 (Fmr1), mRNA

F. Isoforma exones 15, 16 y 17. Ovario de rata. Cebador 17R.



gctccaacagaggaagagagggagagcttcctgcgagaggagacggacggcggcgtggaggagg  
 cggaagaggacaaggaggaagaggaagaggaggaggtttcaaaggaaatgacgatcattcccgaa  
 cagataatcgtccacgtaatccaagagagactaaaggaagaacaactgatggatccctgcagagc  
 acctccagtgaaggaggccggctgcgaccgggaaagatcggaaccagaagaaggaaaa

```

Query 1      GCTCCAACAGAGGAAGAGAGGGAGAGCTTCCTGCGCAGAGGAGACGGACGGCGGCGTGGA 60
            |||
Sbjct 1625   GCTCCAACAGAGGAAGAGAGGGAGAGCTTCCTGCGCAGAGGAGACGGACGGCGGCGTGGA 1684

Query 61     GGAGGCGGAAGAGGACAAGGAGGAAGAGGAAGAGGAGGAGTTTCAAAGGAAATGACGAT 120
            |||
Sbjct 1685   GGAGGCGGAAGAGGACAAGGAGGAAGAGGAAGAGGAGGAGTTTCAAAGGAAATGACGAT 1744

Query 121    CATTCCCGAACAGATAATCGTCCACGTAATCCAAGAGAGACTAAAGGAAGAACAACATGAT 180
            |||
Sbjct 1745   CATTCCCGAACAGATAATCGTCCACGTAATCCAAGAGAGACTAAAGGAAGAACAACATGAT 1804

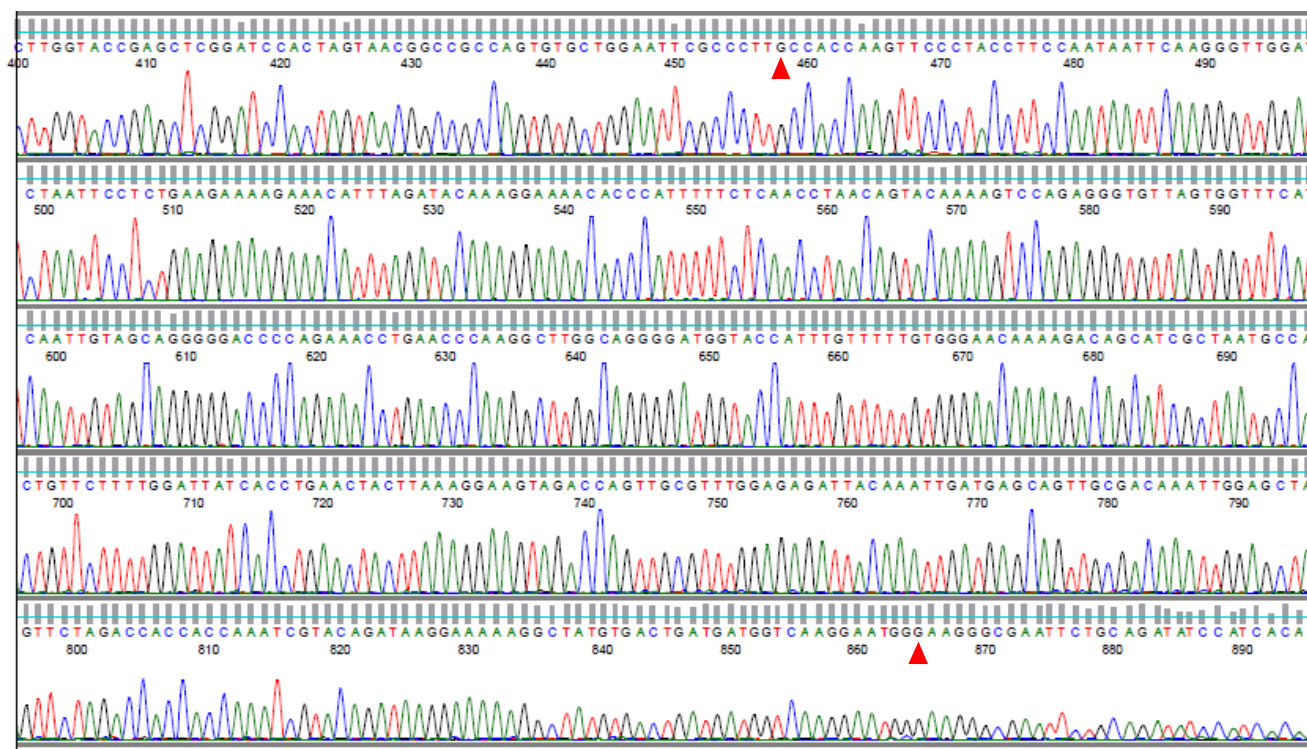
Query 181    GGATCCCTGCAGAGCACCTCCAGTGAAGGGAGCCGGCTGCGCACCGGGAAAGATCGGAAC 240
            |||
Sbjct 1805   GGATCCCTGCAGAGCACCTCCAGTGAAGGGAGCCGGCTGCGCACCGGGAAAGATCGGAAC 1864

Query 241    CAGAAGAAGGAAAA 254
            |||
Sbjct 1865   CAGAAGAAGGAAAA 1878

```

Sbjct: Rattus norvegicus fragile X mental retardation 1 (Fmr1), mRNA

#### G. Isoforma con exón 12. Testículo de rata.



gccaccaagttccctaccttccaataattcaaggggttgatctaattcctctgaagaaaagaacattta  
gatacaaaggaaaacacccatttttctcaacctaacagtacaaaagtcagagg**gtggttagtggtttcat**  
**caattgtagcagggggaccccagaaacctgaacccaaggcttggcag**gggatgggtaccatttgtttttgt  
gggaacaaaagacagcatcgctaatgccactgttcttttggattatcacctgaactacttaaaggaagta  
gaccagttgcgtttggagagattacaaattgatgagcagttgcgacaaattggagctagttctagaccac  
caccaaatcgtaacagataaggaaaaaggctatgtgactgatgatggtcaaggaatggg

Query	1	GCCACCAAGTTCCCTACCTTCCAATAATTCAAGGGTTGGATCTAATTCCTCTGAAGAAAA	60
Sbjct	1180	GCCACCAAGTTCCCTACCTTCCAATAATTCAAGGGTTGGATCTAATTCCTCTGAAGAAAA	1239
Query	61	GAAACATTTAGATACAAAGGAAAACACCCATTTTCTCAACCTAACAGTACAAAAGTCCA	120
Sbjct	1240	GAAACATTTAGATACAAAGGAAAACACCCATTTTCTCAACCTAACAGTACAAAAGTCCA	1299
Query	121	GAGGG	125
Sbjct	1300	GAGGG	1304
Query	187	GGGGATGGTACCATTTGTTTTGTGGGAACAAAAGACAGCATCGCTAATGCCACTGTTCT	246
Sbjct	1303	GGGGATGGTACCATTTGTTTTGTGGGAACAAAAGACAGCA	
Query	247	TTTGGATTATCACCTGAACTACTTAAAGGAAGTAGACCAGTTGCGTTTGGAGAGATTACA	306
Sbjct	1363	TTTGGATTATCACCTGAACTACTTAAAGGAAGTAGACCAGTTGCGTTTGGAGAGATTACA	1422
Query	307	AATTGATGAGCAGTTGCGACAAATTGGAGCTAGTTCTAGACCACCACCAAATCGTACAGA	366
Sbjct	1423	AATTGATGAGCAGTTGCGACAAATTGGAGCTAGTTCTAGACCACCACCAAATCGTACAGA	1482
Query	367	TAAGGAAAAAGGCTATGTGACTGATGATGGTCAAGGAATGGG	408
Sbjct	1483	TAAGGAAAAAGGCTATGTGACTGATGATGGTCAAGGAATGGG	1524

Sbjct: Rattus norvegicus fragile X mental retardation 1 (Fmr1), mRNA

94

```

Query 1      GCTCCAACAGAGGAAGAGAGGGAGAGCTTCCTGCGCAGAGGAGACGGACGGCGGCGTGGA 60
|||||
Sbjct 1625   GCTCCAACAGAGGAAGAGAGGGAGAGCTTCCTGCGCAGAGGAGACGGACGGCGGCGTGGA 1684

Query 61     GGAGGCGGAAGAGGACAAGGAGGAAGAGGAAGAGGAGGAGGTTTCAAAGGAAATGACGAT 120
|||||
Sbjct 1685   GGAGGCGGAAGAGGACAAGGAGGAAGAGGAAGAGGAGGAGGTTTCAAAGGAAATGACGAT 1744

Query 121    CATTCCCGAACAGATAATCGTCCACGTAATCCAAGAGAGACTAAAGGAAGAACAACGAT 180
|||||
Sbjct 1745   CATTCCCGAACAGATAATCGTCCACGTAATCCAAGAGAGACTAAAGGAAGAACAACGAT 1804

Query 181    GGATCCCTGCAGAGCACCTCCAGTGAAGGGAGCCGGCTGCGCACCGGGAAAGATCGGAAC 240
|||||
Sbjct 1805   GGATCCCTGCAGAGCACCTCCAGTGAAGGGAGCCGGCTGCGCACCGGGAAAGATCGGAAC 1864

Query 241    CAGAAGAAGGAAAAGCCAGACAGCGTGGATGGGCTGCAACCACTCGTGA 289
|||||
Sbjct 1865   CAGAAGAAGGAAAAGCCAGACAGCGTGGATGGGCTGCAACCACTCGTGA 1913

Sbjct: Rattus norvegicus fragile X mental retardation 1 (Fmr1), mRNA

```

**Figura 17. Electroferogramas y alineamientos de las distintas isoformas.** Se muestran electroferogramas representativos de cada uno de los fragmentos de amplificación obtenidos con los distintos cebadores a partir del ARNm de tejido ovárico y de testículo. Por debajo de los mismos, se muestran los alineamientos realizados con las secuencias de ARN mensajero de rata depositadas en bases de datos públicas (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Los diferentes exones se representan con distintos colores (exón 11: rojo; exón 12: negrita; exón 13: verde; exón 14: violeta; exón 15: azul; exón 16: rosa; exón 17: marrón). Las flechas rojas indican el comienzo y fin de la secuencia correspondiente a los fragmentos purificados o clonados.

## 5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE UN VECTOR CONTENIENDO TRIPLETES EXPANDIDOS EN CÉLULAS EN CULTIVO

Como se mencionara en el capítulo introductorio, se ha descrito que los niveles del ARN mensajero de *FMRI* se encuentran significativamente elevados en portadores de la premutación, en comparación con los niveles presentes en individuos que poseen alelos con tripletes en el rango normal (Tassone *et al.* 2000, Kenneson *et al.* 2001).

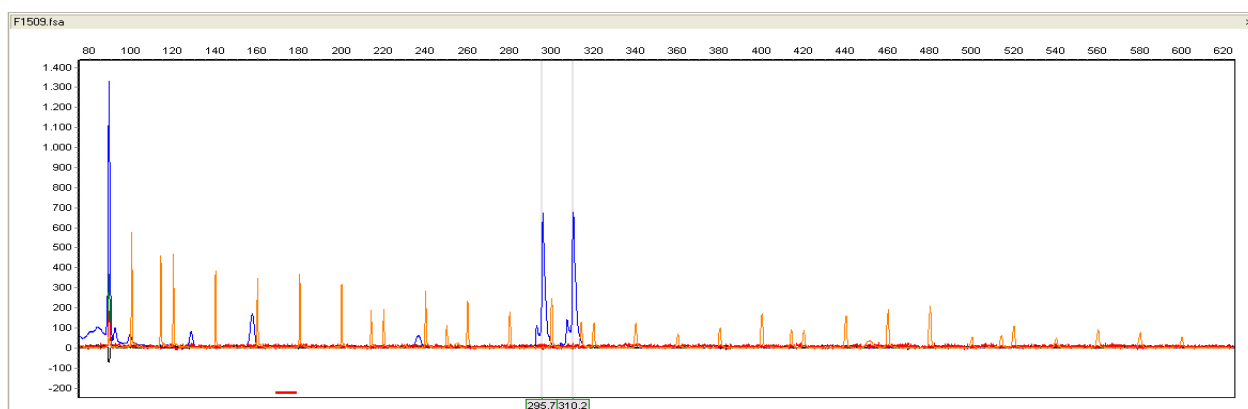
Teniendo en cuenta estas observaciones, quisimos analizar, en células de ovario, la influencia de la presencia de tripletes CGG en el rango de la premutación sobre la transcripción de un gen reportero ubicado río abajo de los mismos. Para tal fin, se transfectaron células KGN con un plásmido conteniendo el extremo 5' UTR del gen *FMRI* con 30 o 95 repeticiones CGG río arriba



del gen reportero *GFP*. En paralelo, las células se transfectaron con un plásmido que contenía al gen reportero de beta galactosidasa ( $\beta$ -gal) para normalizar los resultados, teniendo en cuenta posibles diferencias en las eficiencias de transfección entre los vectores o entre diferentes experimentos.

Las células KGN derivan de un tumor de la granulosa, si bien se utilizan como modelo fisiológico ya que conservan la mayoría de las actividades de las células de granulosa normales (Nishi *et al.* 2001). Aun así, se espera que, como la mayor parte de las células transformadas, posean alteraciones en su secuencia de ADN. Dado que en estas células, y como se consignará más adelante, se ensayó la expresión endógena de algunos genes de apoptosis, era necesario descartar, para una correcta interpretación de los resultados obtenidos, que el gen *FMRI* de la línea celular posea una amplificación de tripletes CGG. Por lo tanto, antes de iniciar los estudios con los vectores mencionados, se extrajo ADN de las células en cultivo y se realizó una PCR para amplificar la región de los tripletes del gen *FMRI*. Se utilizó uno de los cebadores marcados con un nucleótido fluorescente y los fragmentos obtenidos se resolvieron en un secuenciador.

Según se observa en la *figura 18*, se obtuvieron 2 picos en la corrida electroforética que corresponden a los dos alelos del gen: uno con 24 repeticiones CGG y el otro 29. En ambos casos, el número de tripletes se corresponden con el rango normal.



**Figura 18. Electorferograma del producto de la amplificación correspondiente a la región 5' UTR del gen *FMRI* en células KGN.** Figura representativa de la interpretación de la corrida electroforética realizada mediante el programa GeneMarker. El eje Y representa la cantidad de fluorescencia emitida y el eje X el número de pares de bases (pb). Los picos naranjas corresponden al marcador de peso molecular y los azules a los dos alelos amplificados por la PCR. Para el cálculo del número de tripletes, al número de pb obtenidos para cada uno de los picos azules, se le restó 221 pb, correspondientes al producto amplificado que no incluye los tripletes CGG, y el resultado se dividió por 3.

### 5.1. Detección de células que expresan GFP a distintos tiempos de transfección

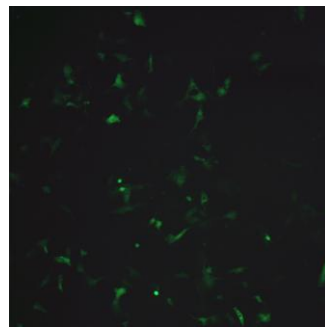
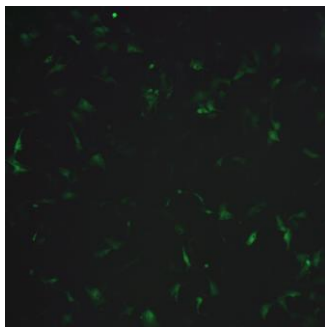
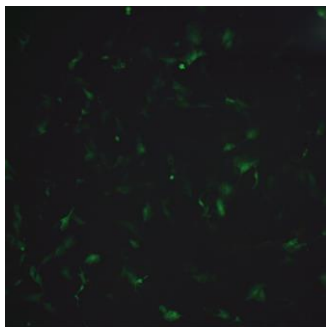
Las células KGN se transfectaron durante 18, 24, 48 y 72 horas con los vectores conteniendo 30 o 95 repeticiones CGG río arriba del gen reportero *GFP* y con el plásmido pCMV- LacZ, para mantener las mismas condiciones utilizadas para los ensayos por RT- qPCR. Transcurridos los tiempos de transfección, se sacaron fotos de las células con un microscopio de fluorescencia a los efectos de estimar la cantidad de células que expresaban *GFP*. Las Figuras 19 y 20 muestran microfotografías representativas de dos experimentos: en el primero se compararon células transfectadas 24, 48 y 72hs (fig. 19A, B y C) y en el segundo, células transfectadas 18 y 24hs (fig. 20A y B).

Para todos los tiempos de transfección, se observó una menor cantidad de células que emitían fluorescencia verde cuando las mismas fueron transfectadas con el plásmido con 95 tripletes.

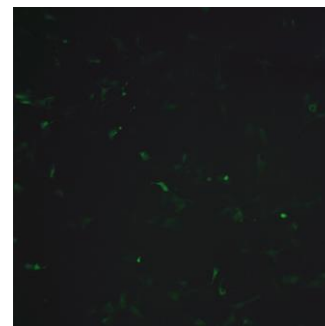
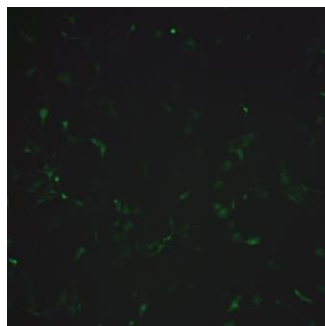
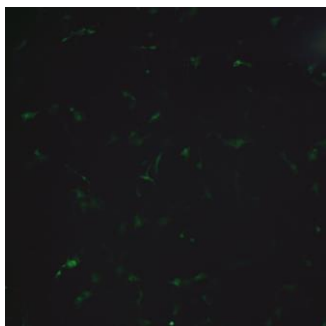
A

24 horas de transfección

30 CGG



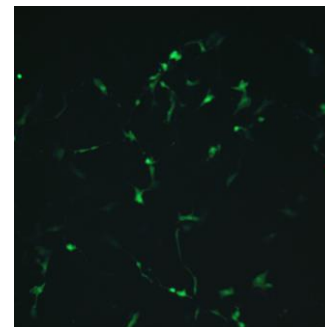
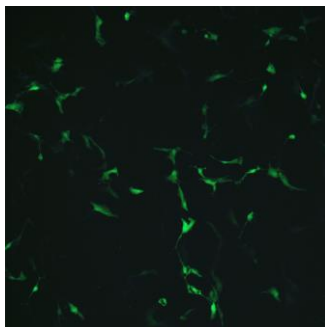
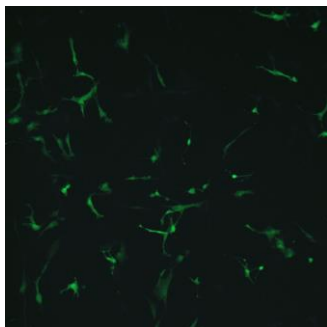
95 CGG



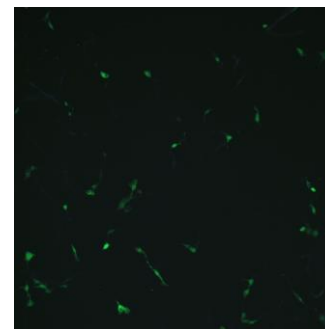
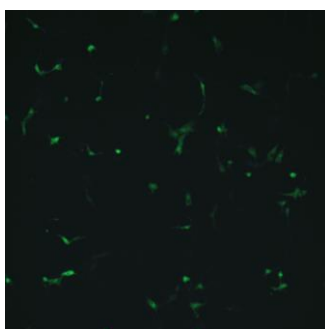
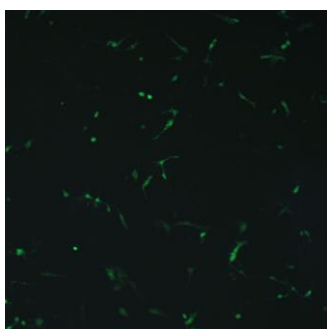
B

48 horas de transfección

30 CGG



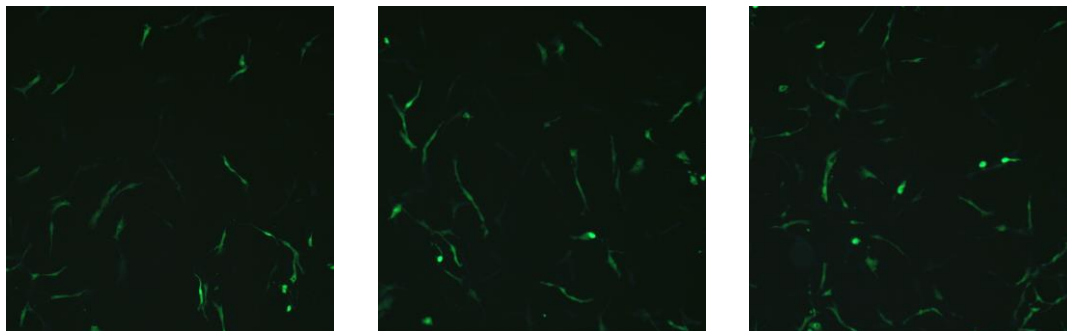
95 CGG



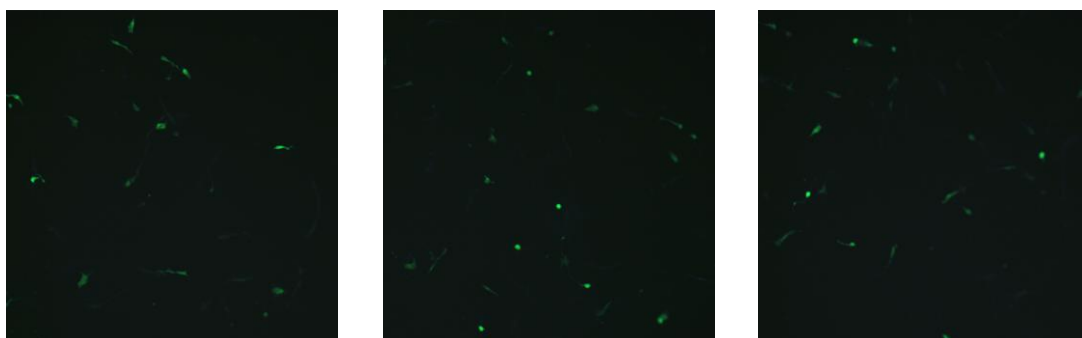
C

72 horas de transfección

30 CGG



95 CGG

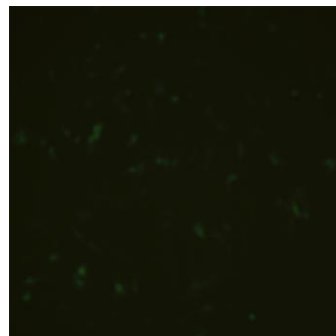
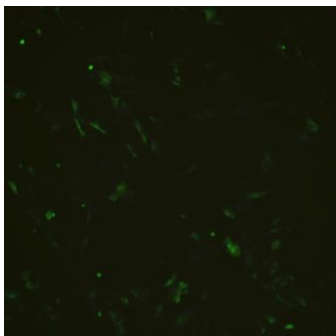
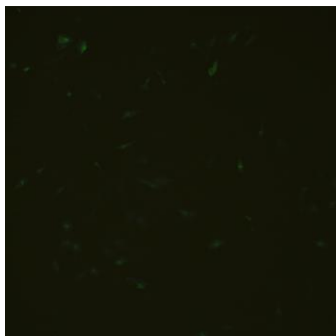


**Figura 19. Expresión de *GFP* en células KGN en cultivo.** Se transfectaron células KGN con los plásmidos conteniendo 30 o 95 tripletes CGG durante 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas. Pasado este tiempo, las células se observaron al microscopio de fluorescencia. En todos los casos las células se co-transfectaron con el plásmido pCMV- LacZ.

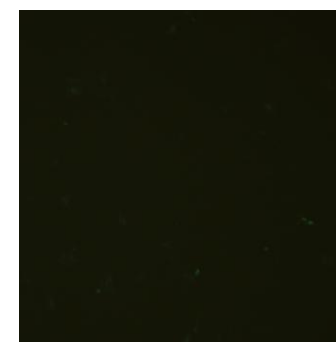
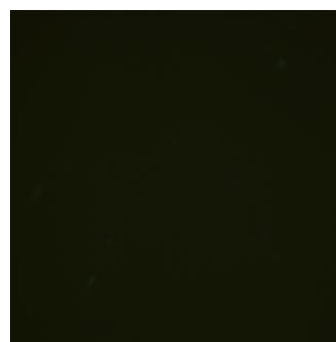
A

18 horas de transfección

30 CGG



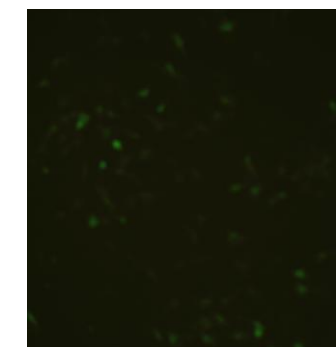
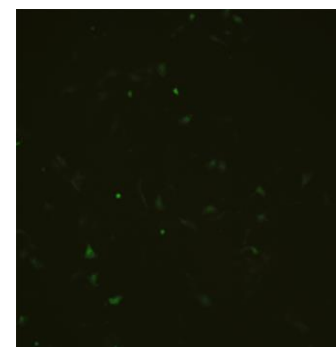
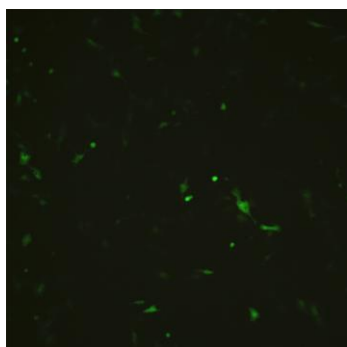
95 CGG



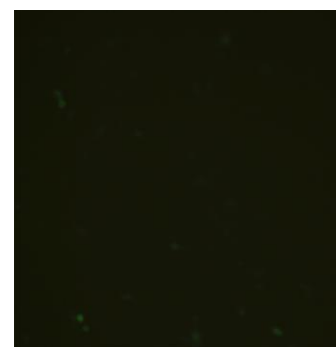
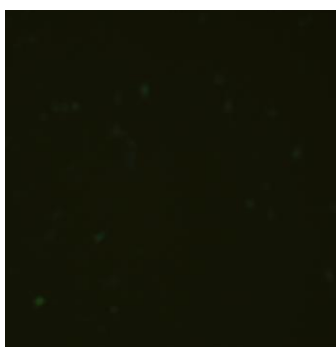
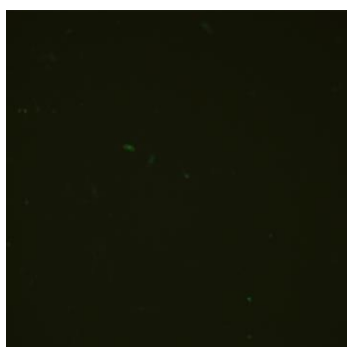
B

24 horas de transfección

30 CGG



95 CGG



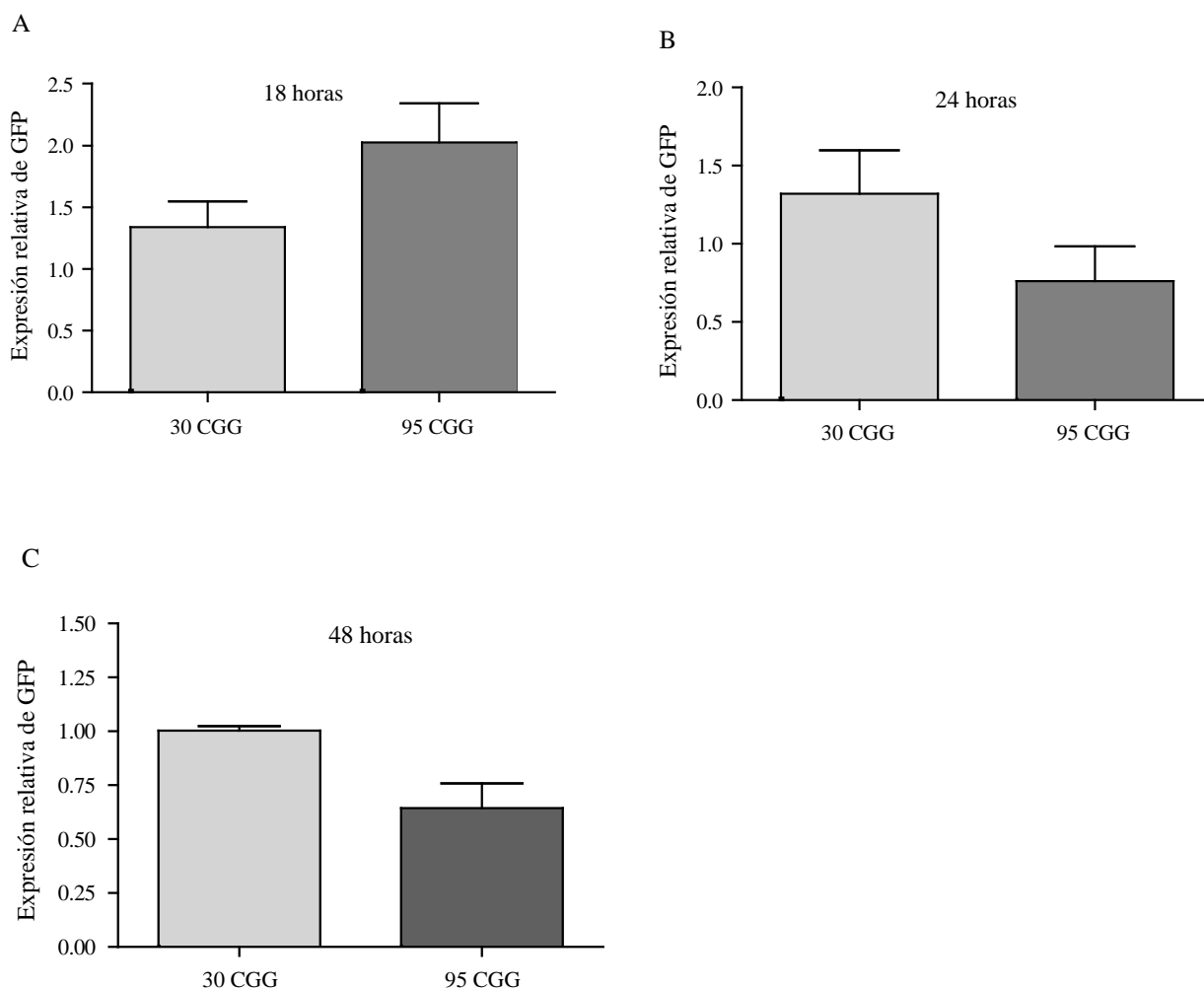
**Figura 20. Expresión de GFP en células KGN en cultivo.** Se transfectaron células KGN con los plásmidos conteniendo 30 o 95 tripletes CGG durante 18 (A) y 24 (B) horas al término de las cuales se observaron al microscopio de fluorescencia. En todos los casos las células se co-transfectaron con el plásmido pCMV- LacZ.

## 5.2. Medición de los niveles de GFP en células KGN y HEK

La expresión de *GFP* y de  $\beta$ -gal en las células transfectadas con los distintos vectores se determinó por RT- qPCR. En los ensayos de transfección, el plásmido con 30 repeticiones fue considerado como el control normal, ya que el mismo representa el número de tripletes más frecuente en la población general (Fu *et al.* 1991).

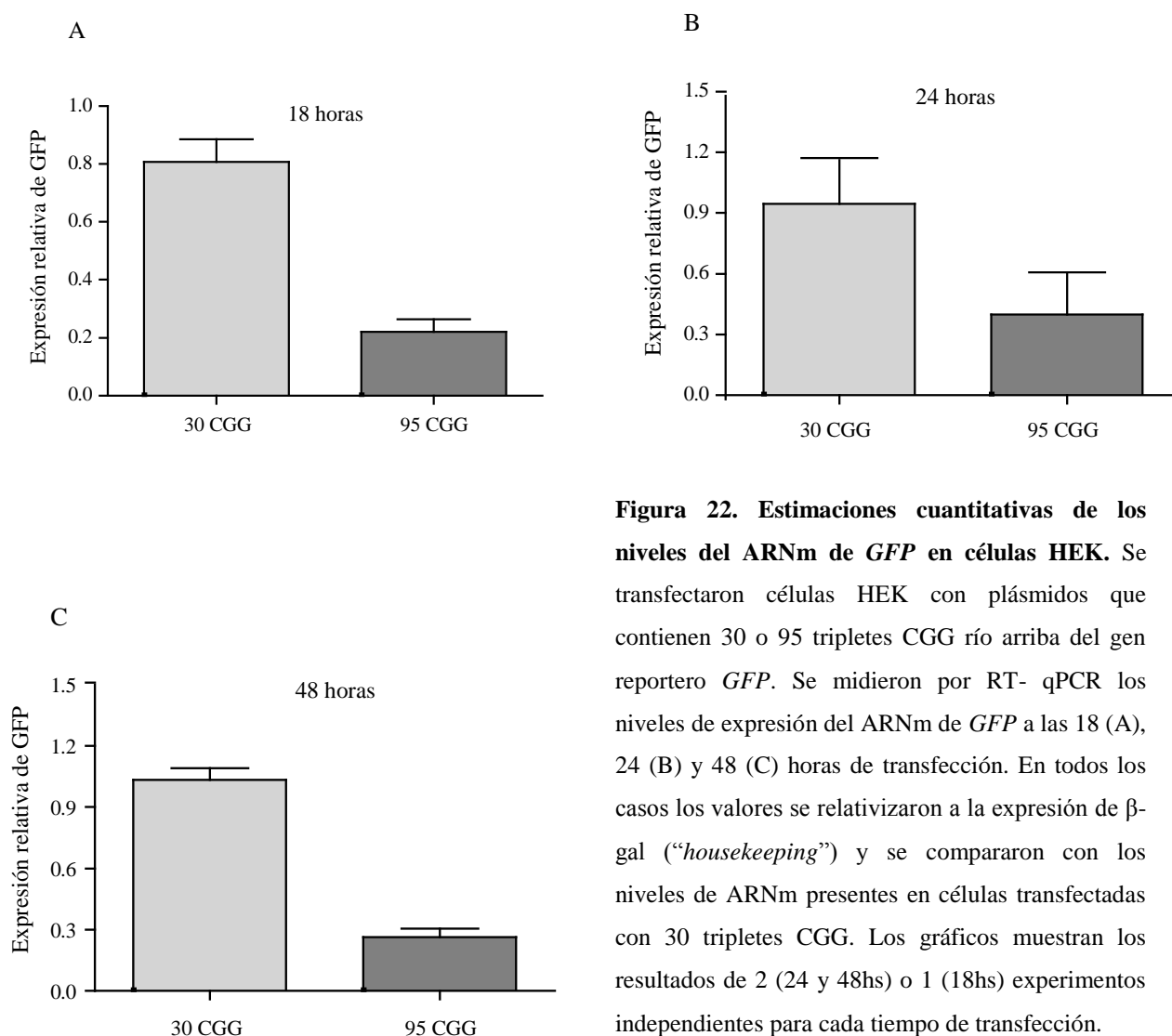
A los efectos de poder comparar los resultados obtenidos en células de ovario con otra línea celular de diferente origen, se utilizaron células HEK, una línea celular embrionaria humana de riñón. En esta línea celular se ha estudiado con anterioridad la expresión de un gen reportero, ubicado en un vector río abajo de la región 5' UTR del gen *FMRI* con distinto número de tripletes CGG (Chen *et al.* 2003).

En nuestros estudios, las células se transfectaron durante 18, 24 o 48 horas con los diferentes vectores. En la *figura 21* se muestran los gráficos obtenidos para cada tiempo de transfección en células KGN. Como se observa, a las 18 horas se detectó una mayor cantidad de mensajero de *GFP* en las células que contenían el vector con 95 tripletes, en comparación con aquellas transfectadas con el que contenía 30 (*fig. 21A*). Esta tendencia se revirtió a las 24 y 48hs, en donde se detectaron mayores niveles del mensajero en las células transfectadas con el vector con 30 tripletes (*fig. 21B* y *21C*, respectivamente). De cualquier manera, en ninguno de los casos estas diferencias resultaron estadísticamente significativas. Se realizaron ensayos también a las 12 horas post-transfección, pero los resultados fueron muy heterogéneos (datos no mostrados), debido, probablemente, a que a este tiempo muchas células aún no se dividieron y por lo tanto el plásmido pudo no haberse incorporado al núcleo.



**Figura 21. Estimaciones cuantitativas de los niveles del ARNm de *GFP* en células KGN.** Se transfectaron células KGN con plásmidos que contienen 30 o 95 tripletes CGG río arriba del gen reportero *GFP*. Se midieron por RT-qPCR los niveles de expresión del ARNm de *GFP* a las 18 (A), 24 (B) y 48 (C) horas de transfección. En todos los casos los valores se relativizaron a la expresión de  $\beta$ -gal (“housekeeping”) y se compararon con los niveles de ARNm presentes en células transfectadas con 30 tripletes CGG. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de 3 (18 y 48hs) o 4 (24hs) experimentos.  $p > 0,05$  (Test de Mann-Whitney).

Los estudios en las células HEK se realizaron al igual que para las células KGN. En la *figura 22* se muestran los gráficos obtenidos para cada tiempo de transfección. Como se observa, los niveles del mensajero de *GFP* resultaron menores en las células transfectadas con 95 tripletes CGG, para los tres tiempos estudiados. Estos ensayos se realizaron como control y los gráficos representan los resultados de 2 (24 y 48hs) o 1 (18hs) experimentos, por lo cual no se realizó en análisis estadístico.



**Figura 22. Estimaciones cuantitativas de los niveles del ARNm de *GFP* en células HEK.** Se transfectaron células HEK con plásmidos que contienen 30 o 95 tripletes CGG río arriba del gen reportero *GFP*. Se midieron por RT- qPCR los niveles de expresión del ARNm de *GFP* a las 18 (A), 24 (B) y 48 (C) horas de transfección. En todos los casos los valores se relativizaron a la expresión de  $\beta$ -gal (“housekeeping”) y se compararon con los niveles de ARNm presentes en células transfectadas con 30 tripletes CGG. Los gráficos muestran los resultados de 2 (24 y 48hs) o 1 (18hs) experimentos independientes para cada tiempo de transfección.

### 5.3. Medición de los niveles de BCL-2 y BAX en células KGN

Varios estudios han relacionado al efecto tóxico del aumento del ARNm de *FMRI* con tripletes en el rango de la premutación, con un aumento de la muerte celular (Arocena *et al.* 2005, Handa *et al.* 2005, Hoem *et al.* 2011).

Con el objetivo de estudiar algunos de los genes relacionados con el mecanismo de apoptosis celular, como aproximación preliminar medimos los niveles de los ARNm de los genes *BCL-2* (proteína anti-apoptótica) y *BAX* (proteína pro-apoptótica) en las células KGN transfectadas con los plásmidos conteniendo diferente número de tripletes, durante 18, 24 y 48hs. Durante la puesta

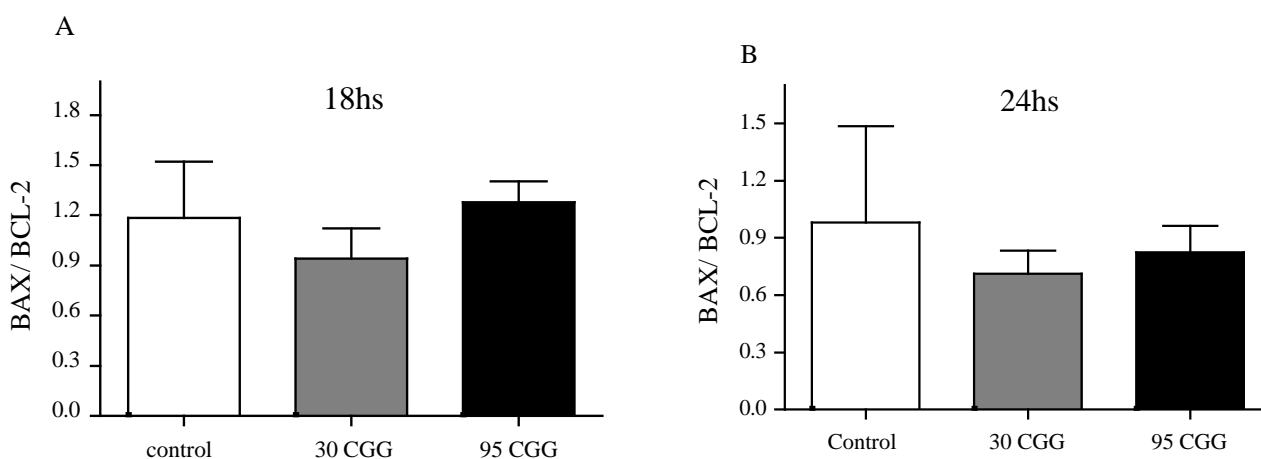


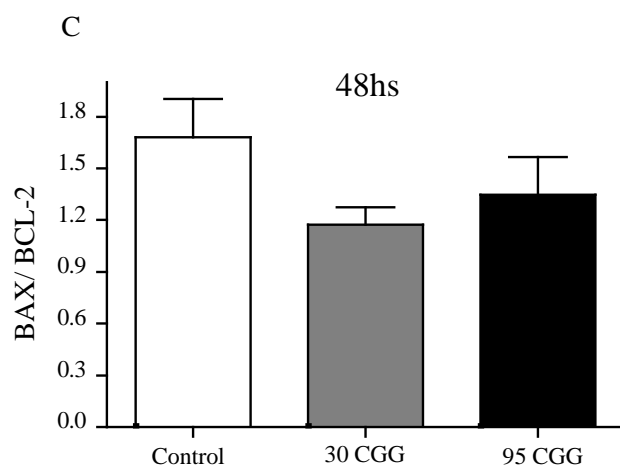
a punto de la técnica, medimos asimismo los niveles de los mensajeros de los genes *FAS* y *FASL* en células transfectadas 24hs. Los valores de Ct resultaron muy elevados (>35) o indeterminados, sugiriendo que los mismos no se expresarían en las células KGN en las condiciones de trabajo.

Como gen *housekeeping* en estos ensayos se utilizó al gen endógeno *GAPDH*.

Como medida de la activación de la vía apoptótica, los resultados se expresaron como la relación de la expresión de *BAX/BCL-2* dado que es el balance entre proteínas pro y anti- apoptóticas, el que determina si la célula entrará o no en apoptosis. En todos los experimentos se incorporaron los resultados obtenidos a partir de dos muestras de células control sin transfectar.

En la *figura 23* se muestran los resultados obtenidos de la relación en la expresión del ARN mensajero para estos genes (*BAX/BCL-2*) en las células KGN, para los 3 tiempos de transfección. En ninguno de los casos detectamos diferencias significativas entre células con 30 y con 95 CGG o con los controles sin transfectar.





**Figura 23. Estimaciones cuantitativas de la relación entre la expresión de los mensajeros de *BAX* y *BCL-2*.**

Se transfectaron células KGN con plásmidos que contienen 30 o 95 tripletes CGG río arriba del gen reportero *GFP*. Se midieron por RT-qPCR los niveles de expresión del ARNm de *BAX* y *BCL-2* a las 18 (A), 24 (B) y 48 (C) horas de transfección. En todos los casos los valores se relativizaron a la expresión de *GAPDH* (“housekeeping”) y se compararon con los niveles de ARNm presentes en células transfectadas con 30 tripletes CGG. Los gráficos muestran los resultados de 3 experimentos independientes para cada tiempo de transfección. Los controles corresponden a valores obtenidos a partir de células sin transfectar. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos.  $p > 0,05$  (Test de Kruskal-Wallis).

# DISCUSIÓN

El gen *FMRI* es el responsable del Síndrome de Fragilidad del X (SFX), la causa más común de retardo mental hereditario. La ausencia de su proteína FMRP provoca el SFX, por lo que su expresión y función ha sido extensamente estudiada en cerebro. A partir del descubrimiento del gen en el año 1991, más de 20 años de estudios permitieron asignarle a la proteína una función como represora de la traducción de ARNm blanco en las terminales sinápticas, modulando de tal forma la plasticidad sináptica, posiblemente a través de la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR). Es probable que esta regulación se dé a través de la vía de los microARNs, ya que se describió que FMRP se une a componentes de esta vía.

Como ya se describiera, la región 5' no codificante del gen *FMRI* presenta una zona de tripletes CGG cuyo número varía en la población normal entre 5 y 44 repeticiones. Sin embargo, pueden existir alelos denominados intermedios (45-54 repeticiones), premutados (55- 200 repeticiones) o con mutación completa (>200 repeticiones) (Fu *et al.* 1991, Oberle *et al.* 1991, Rousseau *et al.* 1995). La mutación completa resulta generalmente en la hipermetilación de la región CpG del promotor del gen (Bell *et al.* 1991). Este evento de hipermetilación causa el silenciamiento del gen con la subsiguiente ausencia de la proteína.

En los últimos años se describió que el estado de premutación en el gen está asociado a otros dos desórdenes clínicos: el Síndrome de temblor/ ataxia asociado a la Fragilidad del X, FXTAS, un desorden neurodegenerativo de inicio tardío y a la Insuficiencia Ovárica Primaria asociada a la Fragilidad del X, FXPOI. Sin embargo, y a pesar de las numerosas evidencias que existen acerca de la asociación del estado de premutación del gen con la FXPOI, la expresión y función de *FMRI* a lo largo del desarrollo folicular ha sido escasamente estudiado, más aun considerando que el gen se transcribe y traduce en muchos tejidos, incluyendo el ovario (Bachner *et al.* 1993, Hinds *et al.* 1993, Bakker *et al.* 2000, Schuettler *et al.* 2011, Willemsen *et al.* 2011, Hoffman *et al.* 2012, Lu *et al.* 2012).

Actualmente se propone que la FXPOI se produciría por un efecto tóxico derivado de la expresión aumentada del ARNm como consecuencia de la presencia de la premutación, y no por

una disminución en los niveles de la proteína. Sin embargo, este mecanismo se postula por analogía a los estudios realizados en FXTAS y es curioso que no se haya estudiado en profundidad si este mismo mecanismo es responsable de la patología ovárica. Hasta la fecha, la función de la proteína FMRP en el ovario se estudió únicamente en modelos de *Drosophila* mutantes para el gen *dFmr1*. En este modelo animal, la proteína estaría involucrada en la especificación de las células germinales y del ovocito (Costa *et al.* 2005, Megosh *et al.* 2006) así como en el mantenimiento de las células *stem* germinales, probablemente regulando la traducción de ARNm específicos a través de la vía de los microARNs (Yang *et al.* 2007). Se demostró, asimismo, un rol de FMRP en el control de la proliferación de la línea germinal en *Drosophila*, lo que sugiere una función específica del gen en estadios tempranos del desarrollo de las células germinales (Epstein *et al.* 2009).

En ovario de mamíferos, son escasos los trabajos relacionados con este tema y abordan principalmente el estudio de la expresión de FMRP. Entre ellos, Bakker y col. (Bakker *et al.* 2000) describieron la expresión de la proteína en células germinales primordiales en ratones hembra y en células foliculares en el adulto. Más recientemente, trabajos de Hoffman y col. (Hoffman *et al.* 2012) y Lu y col. (Lu *et al.* 2012) describieron la expresión de FMRP en células de granulosa (CG), células luteales y ovocito de ratón.

En humanos, la expresión de la proteína en ovarios de mujeres de diferentes edades también fue descrita, principalmente en el ovocito y en CG (Schuettler *et al.* 2011, Willemsen *et al.* 2011). Sin embargo, a nivel prenatal, Rife y col. (Rife *et al.* 2004) describieron que FMRP se expresa únicamente en el ovocito fetal, mientras que las células de paraganulosa que lo rodean, no expresarían la proteína. Por su parte, Schuettler y col. (Schuettler *et al.* 2011), al estudiar biopsias de ovario de una niña de 5 meses, detectaron que la proteína se expresa en células de granulosa una vez que el folículo madura luego del nacimiento.

En ninguno de los estudios descriptos anteriormente se describió la dinámica de expresión de FMRP a lo largo del desarrollo folicular. Solamente en un trabajo de 1993, en el que estudiaron la

expresión del ARNm de *Fmr1* en tejidos de ratón adulto, describieron una baja expresión en el estroma ovárico y niveles crecientes en folículos en desarrollo, los cuales se correlacionaron con la expresión en células de granulosa (Hinds *et al.* 1993).

Teniendo en cuenta los antecedentes antes mencionados, y considerando que nuestro grupo de trabajo se ha dedicado a estudiar algunas de las causas relacionadas a la patogenia de IOP, en la primera parte del trabajo estudiamos la expresión de la proteína FMRP y de su mensajero en 3 estadios foliculares en la rata y describimos su localización celular en cada uno de ellos. Utilizamos ratas prepuberales sin tratar, tratadas con DES y tratadas con PMSG para incluir los estadios más representativos del desarrollo folicular del ovario. Los ovarios de ratas tratadas con DES y PMSG son ampliamente utilizados como modelos para estudiar la dinámica folicular en condiciones fisiológicas (Billig *et al.* 1993, Chun *et al.* 1996, Li *et al.* 1998). Este modelo en rata resultaba adecuado para nuestro objetivo ya que en el ovario inmaduro, compuesto principalmente por folículos preantrales (FPA), el tratamiento hormonal con DES y PMSG desencadena la maduración de una gran cohorte de folículos que, de forma sincronizada, progresa hacia los estadios antrales y preovulatorios, respectivamente (Rani *et al.* 1983, Karakji & Tsang 1995).

Como se mencionara en la Introducción de esta tesis, numerosos estudios describen un aumento en los niveles del ARNm de *FMRI* con tripletes expandidos en individuos con la premutación en el gen, así como en modelos animales (Tassone *et al.* 2000, Kenneson *et al.* 2001, Allen *et al.* 2004, Brouwer *et al.* 2007, Berman & Willemsen 2009). Sin embargo, en la mayoría de los trabajos realizados hasta el momento, los niveles del transcripto se midieron en linfocitos de pacientes con FXTAS, en cerebro de ratones con FXTAS o bien en cerebro de pacientes con el síndrome, *post mortem*. Hasta la fecha, existen sólo dos trabajos en los que se describieron los niveles del ARNm en ovarios de modelos de ratones *knock-in* (KI) para FXPOI. En uno de ellos, los niveles del mensajero se encontraban triplicados, aunque sin cambios en los niveles de la proteína FMRP (Lu *et al.* 2012), mientras que en el otro los niveles resultaron entre 2,4 y 3,5 veces mayores que en controles, según la edad del ratón (Hoffman *et al.* 2012).

Los niveles del ARNm de *FMRI* se han evaluado asimismo en células en cultivo transfectadas con plásmidos con tripletes expandidos en el rango de la premutación, río arriba de un gen reportero. Estos estudios fueron realizados en células HEK293 y en células SK de origen neural, en las que se observó un aumento en los niveles del ARNm del gen reportero al ser transfectadas con tripletes expandidos, respecto de los controles (Chen *et al.* 2003, Handa *et al.* 2005, Hoem *et al.* 2011). Hasta la fecha, sin embargo, no existen estudios en los que se hayan evaluado los niveles del mensajero de *FMRI* en células de ovario en cultivo.

Por lo tanto, y teniendo en cuenta la escasa información acerca de la patogenia de FXPOI, en una segunda etapa nos interesó encarar, de forma preliminar, el estudio de las posibles causas que pudieran estar relacionadas a una disfunción celular ante la presencia de tripletes en el rango de la premutación, en células ováricas humanas en cultivo.

## **1. EXPRESIÓN DE FMRP DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR DE RATA**

### **1.1. Análisis de la expresión de FMRP en los diferentes tipos celulares de ovario mediante inmunohistoquímica**

Los resultados obtenidos del análisis de la expresión de FMRP mediante inmunohistoquímica en distintos estadios de desarrollo folicular, mostraron que la proteína se expresa en los 3 tipos de células foliculares: CG, CT y ovocito, así como en el estroma del ovario. Cabe destacar que la expresión de la proteína, observada en los diferentes estadios foliculares inducidos por los tratamientos hormonales, es un reflejo de los resultados obtenidos en ovarios de ratas adultas sin tratar. Estos resultados, por lo tanto, tienen una correlación fisiológica y no son el resultado del tratamiento *per se*.

En las ratas adultas detectamos marca para FMRP también en células luteales, lo que indicaría un posible rol de la proteína también en las funciones del cuerpo lúteo.

La mayor parte de las células foliculares mostraron marca en el citoplasma; sólo se observó una pequeña fracción de células con marca positiva en el núcleo. Estos resultados concuerdan con la

presencia de señales de localización y exportación nuclear en la proteína (Eberhart *et al.* 1996), si bien se describió que su expresión es mayoritariamente citoplasmática (Devys *et al.* 1993). Asimismo, los resultados estarían en concordancia con la función de FMRP como reguladora de la traducción de mensajeros. Se ha sugerido que FMRP ingresa al núcleo para unirse a sus ARNm blanco y dirigirlos hacia el citoplasma (Eberhart *et al.* 1996).

Como se mencionara, las CG y las CT, tanto en las ratas sin tratamiento (prepuberales) como en las tratadas con DES o PMSG, mostraron expresión de FMRP. La presencia de FMRP en los 2 tipos de células foliculares así como en el ovocito, nos permite presumir que la misma tendría un rol importante en el mantenimiento de la integridad folicular. A su vez, la intensa expresión de la proteína en el citoplasma de los ovocitos de folículos primordiales, sugeriría que su expresión es importante desde estadios tempranos del desarrollo folicular. Consistente con esta idea, en los folículos atrésicos observamos una menor marca para FMRP.

Nuestros resultados indicarían que en el ovario de rata, tal como describieron otros autores para ratón y humano, FMRP se expresa en las células de la granulosa, en las células luteales y en el ovocito. Nuestro estudio demuestra además, que al menos en rata, también habría expresión en las células tecales. Es de destacar, por otro lado y a diferencia de lo publicado hasta el presente, que este sería el primer estudio que demuestra la expresión de FMRP a lo largo del desarrollo folicular en cualquier especie. En trabajos anteriores se ha estudiado la expresión de la proteína en el ovario, pero siempre en un estadio folicular específico y sin seguir su patrón de expresión a lo largo de la foliculogénesis. Además, este es el primer reporte que describe su expresión en el ovario de rata.

## **1.2. Análisis de la expresión de FMRP en folículos en distintos estadios de la foliculogénesis mediante Western-blot**

Es sabido que como resultado del *splicing* alternativo del mensajero de *FMR1*, pueden generarse numerosas isoformas de la proteína, y se propuso que cada una de ellas podría poseer funciones



particulares (Ashley *et al.* 1993, Sittler *et al.* 1996, Denman & Sung 2002). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha estudiado la/s función/es de cada una de las variantes y no se conoce con exactitud el patrón de expresión de las distintas isoformas en los diferentes tejidos. No se han realizado, además, estudios que relacionen las isoformas de la proteína con los mensajeros generados por el *splicing* del gen. A la complejidad debida a los múltiples exones que sufren eventos de *splicing* en el gen *Fmr1*, se suma el hecho de que existen diferentes sitios de inicio de la transcripción y de poliadenilación en el ARNm (Tassone *et al.* 2011). Por otro lado, se describió que FMRP sufre modificaciones post-traduccionales tales como fosforilación y metilación (Denman 2002, Dolzhanskaya *et al.* 2006a, Stetler *et al.* 2006, Blackwell *et al.* 2010, Blackwell & Ceman 2012) y por lo tanto es posible que se detecten asimismo distintas isoformas debido a estas modificaciones.

Dado que la técnica de inmunohistoquímica, por su sensibilidad limitada, no permite apreciar cambios en los niveles de expresión entre los distintos tipos foliculares, ni permite detectar la presencia de isoformas de la proteína, analizamos la expresión de FMRP mediante Western- blot en folículos en los diferentes estadios del desarrollo.

Antes de comenzar con los estudios de la expresión proteica, comparamos dos fracciones subcelulares para luego utilizar aquella que se encontrara enriquecida con FMRP. En la fracción del sobrenadante, resultante de la primera centrifugación y que contiene vesículas, organelas y citosol, la cantidad de la proteína resultó muy escasa, mientras que en el pellet enriquecido con ribosomas y obtenido luego de la segunda centrifugación, FMRP se encontraba en altas cantidades. Este resultado fue coincidente con el hecho de que FMRP se encuentra mayoritariamente en el citoplasma asociada a polirribosomas (Devys *et al.* 1993).

En los estudios por Western- blot detectamos al menos cuatro isoformas de la proteína en todos los estadios estudiados. Considerando a las isoformas en su totalidad, los FPA presentaron los menores niveles proteicos y la expresión aumentó en FAT y en FPO. Estas diferencias fueron más evidentes en la transición de FPA a FAT.

Es importante destacar estos últimos resultados, ya que es sabido que la transición de folículo preantral al estadio de antral temprano es la más susceptible a los eventos de atresia (Hirshfield 1991). Es posible, por lo tanto, que para que no ocurra la atresia, se produzcan cambios importantes en la traducción proteica durante la transición de FPA a FAT, para así continuar con el desarrollo folicular normal. Por otro lado, se cree que los folículos que fueron seleccionados para continuar su desarrollo reciben señales de supervivencia gonadotróficas e intraováricas, mientras que la atresia ocurriría como consecuencia de un sostén inadecuado para mantener su crecimiento (Hu *et al.* 2004).

Considerando que FMRP es una proteína represora de la traducción que se une a numerosos transcriptos, controlando de esta forma su traducción (Laggerbauer *et al.* 2001, Schaeffer *et al.* 2001, Schuettler *et al.* 2011), bajos niveles de la proteína durante el estadio preantral podrían significar una traducción más permisiva de ARNm blanco, en comparación con un estado de mayor represión de los mismos en los folículos en crecimiento. Por otra parte, y dado que se ha demostrado que FMRP interactúa con microARNs (miARNs) y con componentes de esta vía (Caudy *et al.* 2002, Ishizuka *et al.* 2002, Jin *et al.* 2004), y considerando que los miARNs cumplen un rol importante en la regulación post- transcripcional de genes en el ovario y en el tracto reproductor femenino (Fiedler *et al.* 2008, Carletti & Christenson 2009, Christenson 2010), se le podría asignar asimismo a la proteína un rol crucial en el adecuado funcionamiento de la gónada como parte de esta maquinaria regulatoria. De hecho, es sabido que defectos en el control regulatorio de los miARNs pueden conducir a una falla ovárica debida a la disrupción de la foliculogénesis, bloqueo de la ovulación y fallas en el correcto funcionamiento del cuerpo lúteo (Carletti & Christenson 2009).

El desarrollo de los folículos ováricos depende, en gran medida, de la proliferación de las células de la granulosa. La proliferación de estas células comienza a partir de la formación del folículo primario y el crecimiento del folículo se caracteriza por el incremento en las capas de CG (Zhang *et al.* 2011). Considerando que las CG son el tipo celular folicular que más prolifera durante el

desarrollo del folículo, nuestros resultados podrían, asimismo, ser una medida de la contribución de la expresión de FMRP en este tipo celular a la regulación de la fisiología ovárica.

Cuando analizamos por WB el tejido ovárico entero, observamos el mismo patrón de expresión que en folículos aislados: menor expresión en ovarios de ratas prepuberales y un aumento de la proteína en ratas tratadas con DES y con PMSG. Se debe tener en cuenta que al estudiar el ovario entero se están considerando también las células estromales, que, según observamos por IHQ, expresan FMRP. Estos resultados indicarían que, o bien la expresión de la proteína en estas células sigue el mismo patrón que en CG y CT, siendo mayor en FPO, o bien que existe un aumento relativo en la expresión de la proteína en las CG en estadios más avanzados del desarrollo folicular.

En los ensayos de expresión realizados, observamos una alta expresión de FMRP en testículo en concordancia con lo descrito (Devys *et al.* 1993, Tamanini *et al.* 1997, Bakker *et al.* 2000). De igual manera, y de acuerdo con la literatura, no observamos expresión de la proteína en músculo esquelético (Khandjian *et al.* 1998, Bakker *et al.* 2000). La ausencia de banda de  $\beta$ -actina en el músculo en los WB, se debe a que este tejido no expresa la forma  $\beta$  de la proteína. Cuando se realizó una exposición prolongada de la placa de WB, se detectó la presencia de bandas en el músculo, aunque el patrón de las mismas difirió del observado en los otros tejidos. Estas bandas podrían corresponder a la proteína homóloga autosomal de FMRP, la FXR1P, que se expresa de manera abundante en el tejido muscular esquelético (Khandjian *et al.* 1998, Bakker *et al.* 2000). Está descrito que el anticuerpo monoclonal 1C3 contra FMRP que utilizamos en nuestros experimentos puede cruzar con las proteínas homólogas FXR1P y FXR2P en caso de alta expresión de las mismas, por lo cual es posible que estas bandas correspondan a FXR1P, si bien no se puede descartar que se trate de bandas inespecíficas.

Más allá de las diferencias cuantitativas en la expresión total de FMRP halladas en diferentes estadios del desarrollo folicular, no observamos diferencias relativas de expresión entre las distintas isoformas para cada estadio del desarrollo en particular. Sin embargo, se debe tener en

cuenta que la técnica de Western- blot presenta limitaciones en cuanto a su capacidad resolutive y es posible que las bandas que detectamos se correspondan a más de una isoforma con pesos moleculares muy similares. De la misma manera, no se puede descartar que existan isoformas que se expresen diferencialmente en uno u otro estadio y que no las hayamos podido detectar.

Aun teniendo en cuenta las limitaciones de la técnica, es interesante destacar que encontramos en el ovario una expresión relativa de las distintas isoformas que difirió a la observada en los otros tejidos analizados. Si bien no existen trabajos que describan las funciones de las distintas isoformas proteicas, estudios de las variantes de *splicing* del mensajero del gen indican que las diferentes isoformas diferirían en su capacidad de unión a los ARNs, localización intracelular e hidrofobicidad, entre otros (Ashley *et al.* 1993, Sittler *et al.* 1996, Brown *et al.* 1998, Dolzhanskaya *et al.* 2006b).

En resumen, es mucho lo que se sabe acerca de la función de FMRP en el tejido neuronal y el mecanismo por el cual regularía la traducción de mensajeros blanco en cerebro, aunque su función no ha sido estudiada en otros tejidos. Cabe esperar que el mecanismo de acción de la proteína en el ovario sea similar que en cerebro y que se encuentre, de la misma manera, regulando la síntesis de determinadas proteínas. Sin embargo, son necesarios estudios que lo demuestren. Se desconoce, asimismo, qué procesos regula, a qué mensajeros se une y cuáles serían, si las hay, las consecuencias de su ausencia en los ovarios de mamíferos. Hasta la fecha, existe un único trabajo en el que se describen de forma breve y con poco detalle, las características de los ovarios en un modelo de ratón para el Síndrome de Fragilidad del X (SFX) que no expresa FMRP. Los autores observaron que los ovarios de ratones hembras de 3 semanas de edad con SFX eran notablemente más grandes que los controles y que a las 18 semanas su tamaño era un 72% mayor. Hallaron asimismo aumentados los niveles de 3 proteínas, una de ellas con una función en la regulación del desarrollo ovárico y postularon que la ausencia de expresión de *Fmr1* contribuiría al agrandamiento de los ovarios, lo cual sería consistente con un desarrollo folicular precoz (Ascano *et al.* 2012).

Sería interesante también, estudiar la función de cada una de las isoformas y relacionar cada una de ellas con las variantes de ARNm generadas por *splicing* del gen.

Los resultados de este trabajo, por lo tanto, podrían ser el puntapié inicial para el estudio de la función de la proteína en el ovario de mamíferos. Teniendo en cuenta las diferencias en los niveles de FMRP en los distintos estadios del desarrollo del folículo, junto con la presencia de al menos 4 isoformas en el ovario, cuyo patrón de expresión difiere al observado en otros tejidos, es válido suponer que la proteína tiene un papel específico en la gónada y que cada una de sus variantes posee una función diferente. La variación en los niveles de la proteína en los distintos estadios foliculares sugiere que la misma es importante para el desarrollo folicular y que su expresión se encontraría regulada a lo largo del mismo.

## **2. EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO DE *FMRI* DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR DE RATA**

Por estudios de hibridización *in situ*, Bachner y col. (Bachner *et al.* 1993) describieron una expresión aumentada del ARNm de *Fmr1* en ovarios fetales de ratones, que disminuía en el ovario maduro. Los autores propusieron que la alta expresión podría corresponderse con la proliferación de las ovogonias, que ocurre únicamente en el ovario fetal. En el mismo trabajo, demostraron también una alta expresión del mensajero en los testículos fetales y postularon que la alta transcripción del gen en estos estadios de proliferación de las células germinales, sugeriría una función de *Fmr1* en estas células, en ambos sexos. Por lo tanto, y luego de estudiar la expresión de la proteína, quisimos determinar si las diferencias observadas en los niveles de FMRP a lo largo de la foliculogénesis se correspondían con cambios en los niveles de su ARNm.

A diferencia de lo observado para la expresión de FMRP, los ensayos de RT-qPCR mostraron que los FPA y FAT presentaban niveles similares del transcripto de *Fmr1* y que estos niveles eran mayores a los detectados en FPO. Este patrón inverso que observamos a nivel proteico y de

ARNm, sugiere que la expresión del mensajero y su proteína en el ovario estarían reguladas de manera diferente y posiblemente independiente.

Una evidencia a favor de esta última suposición la constituye el hecho de haber observado en los estudios por RT-PCR y por RT-qPCR expresión del ARNm de *Fmr1* en el músculo y ausencia de la proteína en los ensayos por WB. Este hecho demuestra que la presencia del transcripto no necesariamente implica la traducción del mismo, o bien que puede traducirse, pero dar como resultado niveles proteicos que no se corresponden con la cantidad de transcripto en la célula. De hecho, en un trabajo de Todd y col. (Todd *et al.* 2003), los autores detectaron niveles aumentados de FMRP en una región sensorial de la corteza de rata luego de realizar una estimulación de los bigotes del animal. Sin embargo, este aumento no se acompañó de cambios en los niveles del ARNm de *Fmr1*.

Las diferencias observadas en nuestros ensayos entre los niveles de ARNm obtenidos y de su proteína, se pueden explicar por un aumento en la estabilidad del mensajero o por un aumento en la tasa de traducción de la proteína en los estadios tardíos de la foliculogénesis. Por otro lado, el hecho de que FMRP se una a un porcentaje significativo de ARNm en cerebro, incluido su propio mensajero (Brown *et al.* 2001, Darnell *et al.* 2001, Schaeffer *et al.* 2001, Didiot *et al.* 2008) y que la proteína esté implicada en la modulación del *turnover* (balance en los niveles de degradación y síntesis) de algunos ARNm, presume un posible rol de *Fmr1* en la estabilidad de los mismos (De Rubeis & Bagni 2011). Considerando esta última posibilidad como la responsable de las diferencias entre los niveles de la proteína y del transcripto, una explicación alternativa sería que FMRP se una a su mensajero desencadenando algún mecanismo que lleve a su degradación. En tal caso, niveles elevados de la proteína implicarían una mayor degradación de su propio mensajero. Sin embargo, aún queda por establecer si existe un efecto directo de FMRP sobre su propio mensajero. En tal caso, los resultados de este trabajo podrían indicar una posible regulación de FMRP sobre los niveles de su propio ARNm *in vivo* en estadios avanzados del desarrollo folicular, los cuales presentan una expresión aumentada de la proteína.

### 3. POSIBLE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *FMRI* EN FOLÍCULOS ANTRALES TEMPRANOS POR FSH

Como se describió en la Introducción de esta tesis, el modelo actual propone que los receptores mGlu regulan de manera dinámica los niveles de FMRP en la sinapsis, y que al activarse, causan la ubiquitinación y degradación de la proteína. Por otra parte, se han identificado algunos factores de transcripción, entre ellos CTCF, Sp1, Sp3, Nrf2 y USF1/2, que regularían la expresión de *FMRI* (Kumari *et al.* 2005, Lim *et al.* 2005, Smith *et al.* 2006, Lanni *et al.* 2013). Sin embargo, se desconoce si la expresión de FMRP puede ser regulada por hormonas y en particular, nada se sabe acerca de la regulación de su expresión en el ovario.

Por otro lado, es bien sabido que los folículos en el estadio antral temprano dependen en gran medida de la FSH para su progreso y maduración, por lo que son muy sensibles a la acción de esta hormona (McGee & Hsueh 2000). El desarrollo folicular temprano y la actividad endócrina de folículos antrales, en su progreso hacia preovulatorios, depende de la FSH que promueve la supervivencia, proliferación, actividad esteroidogénica y diferenciación de las células de la granulosa (Velasquez *et al.* 2013).

Dado que nuestros resultados demostraban expresión diferencial del gen *Fmr1* a lo largo de la foliculogénesis, y considerando que no se conocen los factores que regulan su expresión en el ovario, nos preguntamos si la FSH podría ser un regulador de su expresión.

Si bien la administración de PMSG *in vivo*, cuya acción mimetiza a la de la FSH, estimula el crecimiento folicular hasta el estadio de preovulatorio, para los estudios de la acción de FSH era necesario el análisis en un sistema *in vitro*. En este contexto, es sabido que los folículos de ratas tratadas con DES son sensibles a la acción de la hormona en sistemas de cultivo (Irusta *et al.* 2010, Velasquez *et al.* 2013), si bien la presencia de FSH estimula el crecimiento de las CG foliculares, aunque sin alcanzar el estadio preovulatorio. Se debe tener en cuenta que la administración *in vivo* de la hormona se ve acompañada del resto de los factores endógenos

responsables de la maduración folicular y esto no ocurre al cultivar los folículos en un sistema *in vitro*.

Considerando que la FSH promueve la proliferación, actividad esteroidogénica y supervivencia de las células de granulosa, se esperaría que una mayor cantidad de la hormona se vea reflejada en un aumento en el número de células de granulosa y por ende en mayores niveles de esteroides sintetizados por las mismas. De hecho, las mediciones de progesterona en el medio de cultivo en nuestros experimentos mostraron una clara tendencia hacia un aumento en sus niveles al aumentar la cantidad de FSH administrada, lo que sugiere que los folículos antrales tempranos efectivamente responden a concentraciones crecientes de la hormona.

Al analizar los niveles del ARNm de *Fmr1* frente a concentraciones crecientes de FSH, no observamos diferencias. Estos resultados indicarían que, al menos para nuestras condiciones de trabajo, la FSH no regularía la transcripción del gen en folículos antrales tempranos en cultivo, si bien no podemos afirmar que esta hormona no regule la expresión de la proteína FMRP *in vitro*, ya que, como se mencionó previamente, los niveles de proteína y mensajero se regularían de manera independiente. En nuestras condiciones de trabajo, lamentablemente no fue posible estudiar la expresión a nivel proteico, dado que se necesitaban cultivar un alto número de folículos en cada condición ensayada, para obtener una cantidad de proteína que se pudiera visualizar por WB luego del fraccionamiento sub-celular. Asimismo, tampoco podemos afirmar que la FSH no regule los niveles de mensajero *in vivo* ya que no necesariamente un sistema de estudio *in vitro* refleje con exactitud lo que ocurre en el organismo.

#### **4. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE ISOFORMAS DE *FMRI* EN FOLÍCULOS AISLADOS Y OVARIOS DE RATA**

Es bien sabido que la presencia de isoformas proteicas codificadas por ARNs mensajeros en los que ocurren eventos de *splicing* alternativo, expande el repertorio funcional de genes. La importancia de este mecanismo en la diversidad proteica se demuestra por el hecho de que cerca



del 95% de los genes de mamíferos con exones múltiples, sufren eventos de *splicing* (Pan *et al.* 2008, Kornblihtt *et al.* 2013).

En el caso particular de *Fmr1*, como se ha mencionado, se sugirió que el gen puede, por *splicing* alternativo de los exones 12, 14, 15 y 17 generar hasta 20 isoformas diferentes de ARNm maduro (Ashley *et al.* 1993, Eichler *et al.* 1993, Verkerk *et al.* 1993, Xie *et al.* 2009). Sin embargo, y al igual que en el caso de la proteína, la mayor parte de estos estudios fueron realizados en tejidos neuronales y la información para otros tejidos es escasa o nula. Un estudio reciente describió la presencia 12 isoformas del transcripto de *Fmr1* en cerebro embrionario y adulto de ratón. Los autores descubrieron que los niveles relativos de las distintas isoformas variaban en hasta dos órdenes de magnitud y que todas ellas se asociaban a polirribosomas, sugiriendo que las mismas se traducirían para dar distintas variantes proteicas (Brackett *et al.* 2013).

Llamativamente, y a pesar de la gran expresión en testículo, ni siquiera para este tejido existe una bibliografía amplia acerca de la expresión de posibles isoformas del mensajero. Por otro lado, para la rata, la única información disponible proviene de la base de datos del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) en donde se describió la presencia del mensajero en cerebro y en un tumor de glándula adrenal, que no contiene al exón 12.

En este trabajo, por lo tanto, nos propusimos describir la presencia, si la hubiera, de diferentes isoformas de *Fmr1* en ovario y folículos de rata en los distintos estadios del desarrollo folicular.

Hallamos que efectivamente se transcriben diferentes isoformas del mensajero. Por estudios de RT-PCR y posterior secuenciación, detectamos la presencia de varias isoformas del gen, cuyos pesos moleculares se correspondieron con los esperados teniendo en cuenta la secuencia del ARNm de *Fmr1* de rata.

En primer lugar, identificamos la expresión de dos isoformas, una que contiene y otra que no contiene al exón 12 del gen. Tanto en ovario como en cerebro y músculo esquelético, fue mayoritaria la isoforma que no contenía al exón. En testículo, por su parte, los niveles de las variantes con y sin el exón resultaron similares. Se ha descrito que la ausencia del exón 12 en

humanos y ratones resulta en una proteína que carece de un importante fragmento hidrofóbico (Ashley *et al.* 1993).

En segundo lugar, demostramos la presencia de las 3 isoformas producto del *splicing* alternativo en el exón 15. En nuestros estudios, las 3 isoformas se expresaron en todos los tejidos analizados y en todos ellos fue mayoritaria la isoforma generada por la utilización del primer sitio de *splicing*. Además, no detectamos diferencias en los niveles relativos de expresión de cada una de las isoformas entre los diferentes tejidos analizados, a diferencia de lo observado para el *splicing* alternativo del exón 12. El uso del segundo sitio aceptor de *splicing* en el exón 15, resulta en una proteína que carece de un sitio de fosforilación. Esto tiene una implicancia biológica importante, ya que esta isoforma proteica sería insensible a la vía de transducción de señales desencadenada por la fosforilación, señal que se sugirió estaría involucrada en el control traduccional en neuronas (Ceman *et al.* 2003, Brackett *et al.* 2013). El uso del tercer sitio aceptor de *splicing*, por su parte, mantiene la delección del sitio de fosforilación y además remueve aminoácidos que abarcan el sitio de reconocimiento necesario para la metilación de la proteína (Dolzhanskaya *et al.* 2006b). La presencia de todas las isoformas en los tejidos analizados, pero en especial una alta expresión de la isoforma que preserva los sitios de fosforilación y metilación, sugieren una regulación de la actividad de la proteína a través de sus modificaciones post-traduccionales.

Por último, la amplificación con los cebadores para detectar *splicing* en el exón 17 mostró una única banda, indicando que en los tejidos estudiados no existiría *splicing* alternativo de este exón. Si bien se sugirió que este exón puede sufrir *splicing* alternativo (Eichler *et al.* 1993) no existen trabajos en los que se hayan identificado las dos isoformas posibles ni se conoce qué diferencias podrían existir entre ellas.

Estos resultados respaldan nuestra hipótesis acerca de que distintas isoformas de la proteína cumplirían funciones celulares diferentes en el ovario. Es poco probable que la expresión diferencial de las isoformas, observada en el tejido ovárico y en los folículos, sea casual, sino que, probablemente, refleje una función específica para cada una de ellas en la gónada.

En líneas generales, los resultados obtenidos en esta tesis son similares a los obtenidos en el trabajo de Xie *et al* (Xie *et al.* 2009), en el cual estudiaron las isoformas de *Fmr1* en varios tejidos de ratón. Al igual que nuestro estudio, los autores mencionados describieron la presencia de isoformas con y sin el exón 12 en varios tejidos, entre ellos corazón, cerebro, bazo, pulmones, músculo esquelético, testículo, riñón e hígado. En forma similar, en todos los tejidos estudiados excepto en testículo, en el cual los niveles de las isoformas con y sin el exón 12 fueron semejantes, la isoforma sin el exón 12 resultó la predominante. Asimismo, al estudiar las isoformas resultantes del *splicing* del exón 15, observaron que la isoforma de mayor peso molecular (resultante de la utilización del primer sitio de *splicing*) resultó mayoritaria para todos los tejidos excepto para el hígado. Por otra parte, al igual que lo observado en nuestros experimentos, los autores detectaron expresión de ARNm en músculo esquelético y el patrón de las isoformas de los exones 12 y 15 en este tejido fue el mismo que el detectado en nuestro trabajo.

Es importante destacar que por la estrategia utilizada en nuestros experimentos, no se detectan todas las combinaciones posibles de *splicing* alternativo, al menos para los exones en estudio, dado que al estudiar las isoformas del exón 15, por ejemplo, podríamos estar ante la presencia de isoformas con o sin el exón 12. De la misma manera, también se describieron eventos de *splicing* alternativo para el exón 14 (Sittler *et al.* 1996), pero la estrategia utilizada no nos permite discriminarlas. Se ha descrito que la ausencia del exón 14 elimina la señal de exportación nuclear (Ashley *et al.* 1993, Sittler *et al.* 1996). Dado que el cebador *forward* utilizado para detectar las isoformas del exón 15 se encuentra en el exón 14, todas las isoformas del exón 15 descritas en este trabajo corresponden a mensajeros que contienen al exón 14 y por lo tanto probablemente codifiquen para proteínas citoplasmáticas.

Si bien al iniciar los estudios de la expresión de las distintas isoformas se realizaron experimentos para amplificar los fragmentos utilizando los cebadores ubicados en los exones 11 y 15 (11F+15R), no fue posible diferenciar adecuadamente las distintas isoformas obtenidas, así como

tampoco lograr una buena resolución y separación para su posterior secuenciación. Una alternativa posible, a futuro, sería intentar clonar cada una de las bandas obtenidas producto de estas amplificaciones.

Cabe aclarar que las secuencias nucleotídicas registradas en la base de datos NCBI y con las cuales comparamos nuestras secuencias provenientes del ovario, son de tejido neuronal o de líneas celulares neuronales. Ninguna de las secuencias nucleotídicas de *Fmr1* de rata de la base de datos, en el momento en que realizamos nuestros estudios, contenía al exón 12 y es por este motivo que nuestra isoforma con el exón no se alinea con ninguna registrada. Lo mismo ocurre con la isoforma III del exón 15, que presenta un fragmento que no se alinea con ninguno de la base de datos. Sin bien en Diciembre del 2013 se depositaron en el NCBI secuencias de rata predichas que contienen tanto al exón 12 como al fragmento de la isoforma III del exón 15, estas secuencias no fueron obtenidas a partir tejidos de rata, sino que se predijeron por análisis computacionales automatizados.

Respecto a la ausencia en la base de datos de las secuencias de la isoforma con el exón 12 y de la isoforma III del exón 15, es posible que se deba a una diferencia en la estrategia utilizada en los diferentes trabajos. Si bien los datos existentes en la base de datos corresponden sólo a cerebro (VERSION U60145.1 GI: 1518668), hipocampo (VERSION AY240947.1 GI: 30143328) y feocromocitoma adrenal (VERSION AF435434.1 GI: 16930610), la secuencia de cerebro fue depositada en el año 1996 y posiblemente no se haya podido identificar a las dos isoformas de *splicing* del exón 12.

Según nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se describen las variantes de *Fmr1* en el ovario de rata, así como la primera vez que se describe la isoforma con el exón 12 y la isoforma III del exón 15 en esta especie. En otras especies, la isoforma conteniendo al exón 12 fue descrita en humano y en ratón, mientras que la isoforma III del exón 15 se describió en humano pero no en ratón.

## 5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE UN VECTOR CONTENIENDO TRIPLETES EXPANDIDOS EN CÉLULAS EN CULTIVO

Como se mencionó precedentemente, numerosos estudios describieron un aumento en los niveles del ARNm de *FMRI* con tripletes expandidos en individuos con la premutación en el gen y en modelos animales (Tassone *et al.* 2000, Kenneson *et al.* 2001, Allen *et al.* 2004, Tassone *et al.* 2004a, Brouwer *et al.* 2007, Entezam *et al.* 2007, Berman & Willemsen 2009). Sin embargo, sólo dos trabajos describieron los niveles del mensajero en ovarios de modelos de ratones para FXPOI (Hoffman *et al.* 2012, Lu *et al.* 2012). Por otro lado, si bien existen trabajos sobre los efectos celulares de la presencia de tripletes expandidos en células transfectadas (Chen *et al.* 2003, Handa *et al.* 2005, Hoem *et al.* 2011), en sólo uno de ellos se analizaron células de ovario en cultivo. Éste se limitó a describir únicamente la existencia de inclusiones intranucleares, sin profundizar en otros mecanismos celulares ni explicar el motivo de su presencia (Sellier *et al.* 2010).

Por lo tanto, y considerando que aproximadamente el 24% de las mujeres portadoras de la premutación desarrollan FXPOI (Allingham-Hawkins *et al.* 1999, Sherman 2000b), en la segunda parte de este trabajo quisimos estudiar los efectos derivados de la expresión de la región 5' UTR del gen *FMRI* que posee un número de tripletes compatibles con el estado de premutación, en células de ovario humanas en cultivo.

Para encarar esta parte del trabajo, utilizamos la línea celular KGN como modelo de células humanas ováricas y la línea celular HEK, derivada de células embrionarias humanas de riñón como línea celular control. Ambos tipos celulares se transfectaron con un plásmido que contenía tripletes en el rango normal (30 CGG) o en el rango de la premutación (95 CGG), río arriba del gen reportero *GFP*.

Si bien las células KGN derivan de un tumor de la granulosa, son ampliamente utilizadas como modelo fisiológico ya que conservan la mayoría de las actividades de las células de granulosa normales (Nishi *et al.* 2001).

Los tres aspectos que quisimos analizar, ya sea de manera cualitativa o cuantitativa, fueron:

- 1- la expresión de la proteína GFP, medida como la aparición de células verdes al ser irradiadas con luz UV,
- 2- la expresión del ARNm de *GFP* y
- 3- la expresión de genes relacionados con la apoptosis. En forma preliminar, se analizó la expresión del ARNm de *BCL-2* y *BAX*, dos genes implicados en la vía intrínseca de la apoptosis.

Para dar inicio a esta parte del trabajo, analizamos el número de tripletes CGG en el gen *FMRI* endógeno de las células KGN. El objetivo de este análisis fue corroborar que las células no tuvieran las expansiones en el rango de la premutación, lo cual podría interferir con los resultados. Si bien parte del estudio comprendía medir por RT-qPCR los niveles de *GFP* con cebadores específicos para este gen, aunque el gen *FMRI* endógeno portara la premutación, en teoría esto no afectaría nuestros resultados. Sin embargo, sí se podría ver afectado el comportamiento general de la célula, ya sea su viabilidad, apoptosis, formación de inclusiones intranucleares o cualquier otro proceso que resulte, según lo descrito en la bibliografía, de un aumento en los niveles del mensajero con tripletes expandidos. Por lo tanto, los procesos antes mencionados podrían representar un factor de confusión especialmente en los estudios de la expresión de los genes de apoptosis realizados. Al comprobar que el número de tripletes en ambos alelos del gen *FMRI* se encontraban dentro del rango normal (24 y 29), los resultados obtenidos reflejan las consecuencias biológicas de las expansiones aumentadas introducidas exógenamente con el plásmido.

### 5.1. Detección de células que expresan GFP a distintos tiempos de transfección

Las células KGN fueron transfectadas durante 18, 24, 48 o 72hs, al cabo de las cuales se observaron bajo microscopio para detectar la expresión de GFP. Estas observaciones fueron cualitativas, y las realizamos previo al estudio de la expresión del mensajero del gen reportero. Hallamos que al transfectar las células con el plásmido que contenía 30 repeticiones, la cantidad

de células que emitían fluorescencia verde fue mayor para todos los tiempos analizados respecto de las que contenían el plásmido con 95 repeticiones CGG.

La primera alternativa que se consideraría para explicar este resultado sería suponer que existe una diferencia en las eficiencias de transfección, que en nuestro caso sería menor en las células con 95 triplete. Si así fuera, el plásmido se incorporaría en menor proporción y resultaría, por lo tanto, en una menor cantidad de células verdes. Sin embargo, y como pudimos observar al realizar los ensayos por RT- qPCR (que se discuten más adelante), los valores de Ct obtenidos para  $\beta$ - gal fueron similares en células con 30 y con 95 repeticiones. Por lo tanto, sería de esperar que la eficiencia de transfección sea similar también para los plásmidos de 30 y de 95 triplete. De hecho, y como se consigna más adelante, cuando se midió la expresión del ARNm de GFP, no se obtuvieron los mismos resultados que al analizar la expresión de la proteína. Por lo tanto, descartamos, en principio, que se trate de una diferencia en la eficiencia de transfección debida al diferente número de triplete que contiene cada plásmido.

Una segunda posibilidad para explicar estas diferencias en la expresión de GFP podría ser que haya una mayor tasa de muerte celular en aquellas células que contienen 95 triplete. Esto explicaría la menor cantidad de células verdes con esta cantidad de repeticiones observadas en todos los tiempos estudiados. Si efectivamente la introducción del plásmido con triplete en el rango de la premutación induce la muerte celular, habría un mayor número de células muertas y por lo tanto se detectarían menos células que expresan la proteína GFP. Considerando que se ha descrito una disminución en la viabilidad celular de células transfectadas con triplete en el rango de la premutación (Arocena *et al.* 2005, Handa *et al.* 2005, Hoem *et al.* 2011), esta posibilidad sería válida para el caso de nuestras células. Sin embargo, a los efectos de comprobar esta hipótesis, sería necesario realizar estudios de viabilidad celular en las diferentes condiciones de transfección.

Una tercera explicación posible para estas observaciones, sería considerar que está disminuida o dificultada la traducción a partir de los mensajeros de *GFP* con los triplete expandidos (95

CGG). De hecho, en varios trabajos se ha descrito una disminución en los niveles de FMRP en individuos con la premutación. Esta disminución puede explicarse por el hecho de que las largas expansiones CGG impiden el correcto ensamblado de la subunidad ribosomal 40S sobre el mensajero de *FMR1* y por ende el comienzo de la traducción (Li & Jin 2012). Por otro lado, en un trabajo de Chen y col. (Chen *et al.* 2003), los autores describieron una menor expresión de la proteína luciferasa en células HEK y SK transfectadas con tripletes en el rango de la premutación río arriba del gen reportero, al compararlas con células con tripletes en el rango normal. Se ha descrito asimismo una disminución en la expresión de FMRP en cerebro en dos modelos de ratón *knock-in* para la premutación (Brouwer *et al.* 2007, Entezam *et al.* 2007), en el cerebro de un hombre con 113 repeticiones CGG *post mortem* (Tassone *et al.* 2004a) y en líneas celulares linfoblastoides provenientes de hombres portadores de la premutación (Kenneson *et al.* 2001, Primerano *et al.* 2002). Por lo tanto, nuestros resultados podrían, aunque en forma no excluyente con la posibilidad de la muerte celular programada, corroborar las observaciones realizadas por otros autores en diferentes sistemas. En tal caso, debería existir un número similar de células que expresen GFP en ambas condiciones pero con distinta intensidad de color verde que se correspondería con una tasa de traducción disminuida en las células con 95 tripletes. Sin embargo, se debe considerar el umbral de detección que posee el microscopio y que posiblemente existan células que expresen GFP pero en cantidades tan bajas que no se pueda detectar al observarlas en este tipo de ensayo.

## 5.2. Medición de los niveles de GFP en células KGN y HEK

Los niveles de expresión del ARNm de *GFP* se midieron por RT-qPCR en las células KGN y HEK, transfectadas con los plásmidos conteniendo 30 CGG o 95 CGG, a distintos tiempos luego de la transfección.

Nuestros resultados mostraron una tendencia hacia un aumento en los niveles de mensajero de *GFP* con 95 repeticiones luego de 18 horas de transfección, si bien las diferencias no resultaron



estadísticamente significativas. En los otros dos tiempos estudiados, 24 y 48 horas, esta tendencia se revirtió ya que se observó una mayor la expresión del mensajero de *GFP* en aquellas células que poseían el vector con 30 tripletes. Estas diferencias en los niveles del mensajero a distintos tiempos podrían indicar una regulación en la expresión del ARNm y que, en particular luego de 18 horas de transfección, ocurrirían cambios en la misma.

Cabe aclarar que en estos estudios las comparaciones entre los niveles de expresión se realizaron siempre entre células transfectadas con 30 o con 95 tripletes CGG para un mismo tiempo. En ningún momento comparamos los niveles de expresión entre los distintos tiempos, por lo que no podemos afirmar, por ejemplo, que para las células con 95 repeticiones, los niveles del ARNm sean mayores a las 18 que a las 24 y 48hs.

Es interesante detenerse en lo que ocurre con los niveles de ARNm y de proteína de GFP luego de 18hs de transfección. Como describimos en el apartado anterior, cuando comparamos la cantidad de células verdes con 30 o con 95 tripletes CGG, observamos un menor número de células que emitían fluorescencia verde en aquellas que contenían 95 repeticiones. Sin embargo, en los estudios de expresión del mensajero, se observó una mayor expresión del mismo en células con 95 CGG. Para este tiempo, por lo tanto, nuevamente resultan inversos los patrones de expresión de la proteína y del ARNm. Por otro lado, es llamativo que solamente a las 18hs sean mayores los niveles del mensajero con 95 tripletes, considerando que está ampliamente descripto el aumento en los niveles de los mensajeros con tripletes en el rango de la premutación. Sin embargo, es posible que exista un pico de expresión a las 18hs que desencadene la muerte celular (si esta fuera la explicación) y que resulte en una menor cantidad de células que producen el mensajero y por lo tanto en una disminución de sus niveles a las 24 y 48hs de transfección.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, podríamos hipotetizar, con las limitaciones de nuestro estudio, que lo mismo ocurriría en los ovarios, o más específicamente en las células de granulosa de mujeres portadoras de la premutación, y a preguntarnos si este aumento en la expresión del mensajero tiene alguna implicancia en la patofisiología del ovario de mujeres con

FXPOI. Sin embargo, se debe tener en cuenta la dificultad que representaría acceder a muestras de ovario de mujeres con la premutación.

Ante esta dificultad, los modelos animales constituyen una posibilidad de estudio, con las limitaciones que los mismos pudieran representar. Para el caso de la premutación, el efecto de la presencia de expansión de tripletes del gen *Fmr1* se estudió únicamente en 2 modelos de ratones *knock-in* (Hoffman *et al.* 2012, Lu *et al.* 2012). Como ya se mencionó, los niveles de ARNm de *Fmr1* se encontraban aumentados en los ovarios de estos ratones. Los autores describieron además, la presencia de anomalías ováricas como ser una disminución acelerada del número de folículos con la edad, una mayor incidencia de quistes ováricos, un número reducido de células de granulosa, niveles aumentados de ubiquitina en el ovocito, disminución en la fertilidad, reducción del número de folículos en crecimiento y alteraciones en los niveles hormonales séricos.

Por otra parte, es sabido que la presencia de niveles aumentados de ARNm con tripletes expandidos en el rango de la premutación puede conducir a la formación de inclusiones intranucleares en neuronas y astrocitos de pacientes con FXTAS, en modelos animales del síndrome y en células neuronales en cultivo. Estas inclusiones fueron encontradas también en otros tejidos fuera del sistema nervioso central, entre ellos en el testículo (Garcia-Arocena & Hagerman 2010, Hunsaker *et al.* 2011). Se cree que las inclusiones contribuyen a las patologías asociadas al estado de premutación en el gen *FMRI*, aunque el mecanismo de su toxicidad no es del todo comprendido (Pretto *et al.* 2013).

Las inclusiones intranucleares se detectaron asimismo en modelos de ratones transgénicos que expresan los tripletes CGG expandidos en el contexto tanto de *Fmr1* como de *EGFP*. Esta observación demostró que las repeticiones aumentadas, aunque se encontrasen fuera del contexto del gen *Fmr1*, eran suficientes para inducir la formación de inclusiones (Hashem *et al.* 2009).

Una posibilidad que explicaría la toxicidad de las inclusiones sería que proteínas de unión a tripletes CGG queden secuestradas dentro de las mismas, ya que estas contienen al ARNm de *Fmr1* (Tassone *et al.* 2004b). Entre las proteínas que se han identificado secuestradas en las

inclusiones, se encuentra Sam68, involucrada en la regulación del *splicing* alternativo (Sellier *et al.* 2010). Es posible que el secuestro de estas proteínas de unión al ARN con tripletes CGG, impida que las mismas lleven a cabo sus funciones normales, contribuyendo, de esta forma, a la patología (Hagerman & Hagerman 2013). De hecho, aunque sin demostrar que exista un aumento en el ARN mensajero, Sellier y col. (Sellier *et al.* 2010) describieron la presencia de agregados intranucleares en 2 líneas celulares de ovario humano.

Teniendo en cuenta esta información, nuestras células KGN transfectadas con un plásmido con 95 tripletes río arriba del gen reportero *GFP* representarían a futuro, un buen modelo para el estudio de la formación de inclusiones intranucleares. Por otro lado, sería interesante también, en un futuro, estudiar los patrones de *splicing* en células KGN y analizar si los mismos se encuentran alterados como consecuencia de la introducción de un plásmido con tripletes en el rango de la premutación.

Los resultados obtenidos en las células HEK utilizadas como control, mostraron un mayor nivel de expresión del mensajero de *GFP* en células con 30 tripletes en los 3 tiempos de transfección estudiados. Esto difiere de lo reportado en el trabajo de Chen y col. (Chen *et al.* 2003) en el que estudiaron células HEK293 transfectadas con plásmidos con 16, 30, 42, 62 y 99 tripletes CGG río arriba del gen reportero de luciferasa. Los autores observaron un aumento moderado en los niveles de transcripción luego de 24 horas de transfección, en aquellas células que poseían los plásmidos con 42, 62 y 99 repeticiones CGG (Chen *et al.* 2003). En un segundo trabajo de Handa y col. (Handa *et al.* 2005) analizaron células HEK293 pero con la inserción de forma endógena de vectores que contenían 22, 30, 120 y 176 tripletes CGG entre un promotor inducible y el gen de luciferasa. Los autores observaron un aumento en la expresión del ARN de luciferasa ante la inducción del promotor en las células que poseían 176 repeticiones CGG.

Si bien nuestros resultados en células HEK difieren a lo descripto por otros autores, debemos considerar que se trata de diferentes plásmidos con diferentes genes reporteros además de que, en

particular para el caso de 18hs de transfección, nuestro número de réplicas de los experimentos es bajo.

### 5.3. Medición de los niveles de BCL-2 y BAX en células KGN

Como se mencionara precedentemente, un trabajo de Handa y col. (Handa *et al.* 2005) describe que la expresión del ARN conteniendo 176 tripletes CGG causa un aumento en la probabilidad de muerte celular y que la misma se produciría por apoptosis. En forma similar, otros dos grupos de investigación mostraron una reducción en la viabilidad celular en células neurales humanas SK, que expresaban los tripletes expandidos en el rango de la premutación. En el trabajo de Hoem y col. (Hoem *et al.* 2011) hallaron una disminución en la viabilidad celular en presencia de tripletes expandidos si bien no describieron el mecanismo por el cual se produciría. Por otro lado, en el estudio de Arocena y col. (Arocena *et al.* 2005) resaltaron que la apoptosis no sería el mecanismo implicado en la muerte celular observada. Se ha demostrado asimismo una disminución en la viabilidad de neuronas en cultivo provenientes de ratones hembra heterocigotas para la premutación (Chen *et al.* 2010). Por otro lado, Lu y col. (Lu *et al.* 2012), en su trabajo en un modelo de ratón para FXPOI portador del alelo premutado con 90 repeticiones, observaron que muchos de los folículos antrales tempranos eran atrésicos y contenían células de granulosa positivas para la tinción por TUNEL. En virtud de sus resultados, los autores sugirieron que el alelo premutado podría inducir un aumento de la apoptosis en los ovarios.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y considerando nuestros resultados sobre la expresión de la proteína GFP y de su ARNm luego de 18hs de transfección, nos propusimos estudiar si el proceso de apoptosis podría ser uno de los mecanismos implicados en los resultados obtenidos.

Con este fin, elegimos inicialmente 4 genes que se relacionan con el proceso de apoptosis; el par *BCL-2/ BAX*, implicados en la vía intrínseca y el par *FAS/FASL* de la vía la extrínseca, y medimos por RT-qPCR sus niveles en células KGN transfectadas durante 18, 24 y 48hs.

En el trabajo en el que se describió el establecimiento de la línea celular KGN, entre otros parámetros que se testearon fue la utilidad de esta línea celular para su uso en experimentos de apoptosis. En particular, estudiaron la apoptosis mediada por FAS y concluyeron que es muy probable que el mecanismo apoptótico que ocurre en células de granulosa normales se mantenga en las KGN (Nishi *et al.* 2001). Es sabido, además, que el sistema FAS/FASL es uno de los inductores de apoptosis mejores caracterizados en células de granulosa de mamífero. En células KGN en cultivo se observó un aumento en los niveles de la proteína FASL 36hs luego de la inducción de la muerte celular (Matsuda *et al.* 2008, Matsuda *et al.* 2011, Matsuda *et al.* 2012).

Sin embargo, en otro trabajo realizado en células KGN, no se detectaron variaciones en los niveles de las proteínas FAS y FASL al inducir la apoptosis, si bien los autores aclararon que no fueron estudiados otros sistemas mediados por receptor que también podrían estar implicados en el mecanismo en esta línea celular (Irusta *et al.* 2013).

En nuestro estudio, cuando realizamos la puesta a punto de las condiciones de RT-qPCR para los genes de *FAS* y *FASL*, los valores de Ct obtenidos fueron muy altos o indeterminados para todas las concentraciones testeadas. Este análisis preliminar sugeriría, por lo tanto, que estos genes no se expresarían en estas células bajo las condiciones de cultivo y de transfección utilizadas y por este motivo no proseguimos con el análisis de su expresión.

Los miembros de la familia de proteínas BCL-2 también tienen un rol importante en el crecimiento y atresia folicular, ya que regulan la apoptosis de la célula germinal y de las células somáticas (Matsuda *et al.* 2012). Woods y col. (Woods *et al.* 2008a, Woods *et al.* 2008b) evaluaron la expresión de estos genes en células KGN en cultivo y hallaron que los niveles del ARNm y de la proteína de BAX aumentaban 18hs luego de la inducción de la apoptosis. Por otro lado, más recientemente se confirmó, utilizando ARNs de interferencia, la actividad pro-apoptótica de BAX en las células KGN (Sai *et al.* 2012). De este modo, los autores del trabajo concluyeron que BAX sería esencial para el proceso de apoptosis en estas células. En concordancia con estos trabajos, Irusta y col. (Irusta *et al.* 2013) describieron que la relación en la

expresión de las proteínas BAX/ BCL-2 se encontraba aumentada cuando se inducía la apoptosis en las células KGN.

En nuestro estudio preliminar sobre la expresión de *BAX* y *BCL-2* no detectamos diferencias significativas en la relación de la expresión de ambos genes para ninguno de los tiempos ni para los distintos plásmidos ensayados. Para el caso de las células transfectadas con 30 tripletes, se esperaba una relación de *BAX/ BCL-2* similar a la obtenida para las células sin transfectar, ya que las 30 repeticiones representan el número de repeticiones más frecuente en la población. Dado que se trata de resultados preliminares, sería necesario realizar más experimentos tendientes a determinar si existe una diferencia en la relación *BAX/ BCL-2* en presencia de tripletes expandidos, así como evaluar otros miembros de la familia de BCL-2 y otros genes del sistema receptor-ligando. Por otro lado, sería necesario evaluar los niveles de expresión de las proteínas de estos y otros genes implicados en el proceso de apoptosis. Finalmente, si se observaran diferencias, la presencia de apoptosis debería evaluarse por el método de TUNEL. Debe considerarse que la apoptosis ocurre a través de una compleja cascada de señalización que se encuentra muy regulada en distintos puntos. Además, y considerando que varias proteínas sólo se expresan transitoriamente, resulta crítico conocer la cinética de la muerte celular en el modelo en estudio (Elmore 2007).

Si bien nuestro modelo celular puede ayudarnos a comprender el mecanismo que causa la FXPOI, nunca podrá asemejarse a lo que ocurre *in vivo* donde las células expresan el ARNm con tripletes expandidos de manera estable y se encuentran en un contexto y condiciones muy diferentes. Aun con las limitaciones que presenta nuestro trabajo por tratarse de células en cultivo y transfectadas en forma transitoria, consideramos importante destacar la importancia de haber iniciado los estudios tendientes a dilucidar los efectos patológicos que se pudieran desencadenar en células ováricas humanas debido a la presencia de tripletes expandidos en el gen *FMRI*.

# CONCLUSIONES

Este trabajo de tesis representa el primer estudio realizado sobre la expresión del gen *Fmr1* a lo largo del desarrollo folicular. Los resultados obtenidos permiten concluir que:

- La proteína FMRP se expresa en células de granulosa, células de la teca y células estromales de folículos preantrales (FPA), antrales tempranos (FAT) y preovulatorios (FPO) de la rata. Además, la proteína se expresa en el ovocito en estos 3 estadios de la foliculogénesis. En todos los tipos celulares, la expresión de FMRP es mayoritariamente citoplasmática.
- Hay una tendencia hacia un aumento en la expresión de FMRP a medida que el folículo se desarrolla, su expresión es menor en FPA y aumenta en FAT y FPO. En los 3 estadios foliculares se expresan al menos 4 isoformas de la proteína cuyos patrones de expresión difieren a los observados en otros tejidos.
- La expresión del ARNm de *Fmr1* es mayor en FPA y FAT que en FPO. Este patrón inverso al observado para la proteína, sugiere una regulación diferente para la expresión del mensajero y su proteína.
- La expresión del ARNm de *Fmr1* en folículos antrales tempranos en cultivo no se regularía por la FSH.
- En los folículos en los 3 estadios estudiados se expresan las dos isoformas del mensajero que resultan del *splicing* alternativo del exón 12 y las 3 isoformas producto del *splicing* en el exón 15. En particular, en este trabajo se describe por primera vez la variante que contiene al exón 12.
- Células de ovario humanas transfectadas con un vector que posee tripletes en el rango de la premutación, expresan menor cantidad de la proteína reportera que aquellas células transfectadas con tripletes en el rango normal.
- Existiría una tendencia hacia un aumento en los niveles del ARNm en células que contienen tripletes expandidos luego de 18hs de transfección.



***Estos resultados indicarían que:***

***Fmr1 cumpliría un rol en la función folicular a través de la expresión diferencial de sus isoformas.***

***La presencia de tripletes CGG expandidos en el rango de la premutación sugiere un efecto biológico sobre células ováricas humanas.***

# BIBLIOGRAFÍA

- Abramovich D, Rodriguez Celin A, Hernandez F, Tesone M & Parborell F** 2009 Spatiotemporal analysis of the protein expression of angiogenic factors and their related receptors during folliculogenesis in rats with and without hormonal treatment. *Reproduction* **137** 309-320.
- Adashi EY, Resnick CE, Rosenfeld RG, Powell DR, Koistinen R, Rutanen EM & Seppala M** 1993 Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 is an antigonadotropin: evidence that optimal follicle-stimulating hormone action in ovarian granulosa cells is contingent upon amplification by endogenously-derived IGFs. *Adv Exp Med Biol* **343** 377-385.
- Allen EG, He W, Yadav-Shah M & Sherman SL** 2004 A study of the distributional characteristics of FMR1 transcript levels in 238 individuals. *Hum Genet* **114** 439-447.
- Allen EG, Sullivan AK, Marcus M, Small C, Dominguez C, Epstein MP, Charen K, He W, Taylor KC & Sherman SL** 2007 Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. *Hum Reprod* **22** 2142-2152.
- Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT, Lee C, Hudson R, Gorwill H, Nolin SL, Glicksman A & et al.** 1999 Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study--preliminary data. *Am J Med Genet* **83** 322-325.
- Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME & Lindner HR** 1975 Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J Cell Biol* **67** 894-900.
- Arocena DG, Iwahashi CK, Won N, Beilina A, Ludwig AL, Tassone F, Schwartz PH & Hagerman PJ** 2005 Induction of inclusion formation and disruption of lamin A/C structure by premutation CGG-repeat RNA in human cultured neural cells. *Hum Mol Genet* **14** 3661-3671.

- Ascano M, Jr., Mukherjee N, Bandaru P, Miller JB, Nusbaum JD, Corcoran DL, Langlois C, Munschauer M, Dewell S, Hafner M, Williams Z, Ohler U & Tuschl T** 2012 FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. *Nature* **492** 382-386.
- Ashley CT, Sutcliffe JS, Kunst CB, Leiner HA, Eichler EE, Nelson DL & Warren ST** 1993 Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat Genet* **4** 244-251.
- Bachelot A, Rouxel A, Massin N, Dulon J, Courtillot C, Matuchansky C, Badachi Y, Fortin A, Paniel B, Lecuru F, Lefrere-Belda MA, Constancis E, Thibault E, Meduri G, Guiochon-Mantel A, Misrahi M, Kuttann F & Touraine P** 2009 Phenotyping and genetic studies of 357 consecutive patients presenting with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol* **161** 179-187.
- Bachner D, Manca A, Steinbach P, Wohrle D, Just W, Vogel W, Hameister H & Poustka A** 1993 Enhanced expression of the murine FMR1 gene during germ cell proliferation suggests a special function in both the male and the female gonad. *Hum Mol Genet* **2** 2043-2050.
- Bagni C, Tassone F, Neri G & Hagerman R** 2012 Fragile X syndrome: causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. *J Clin Invest* **122** 4314-4322.
- Bakker CE, de Diego Otero Y, Bontekoe C, Ragho P, Luteijn T, Hoogeveen AT, Oostra BA & Willemsen R** 2000 Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse. *Exp Cell Res* **258** 162-170.
- Bell MV, Hirst MC, Nakahori Y, MacKinnon RN, Roche A, Flint TJ, Jacobs PA, Tommerup N, Tranebjaerg L, Froster-Iskenius U, Kerr B, Turner G, Lindenbaum RH, Winter R, Prembrey M, Thibodeau S & Davies KE** 1991 Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. *Cell* **64** 861-866.

- Berman RF & Willemsen R** 2009 Mouse models of fragile X-associated tremor ataxia. *J Investig Med* **57** 837-841.
- Bhakar AL, Dolen G & Bear MF** 2012 The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses). *Annu Rev Neurosci* **35** 417-443.
- Billig H, Furuta I & Hsueh AJ** 1993 Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* **133** 2204-2212.
- Blackwell E & Ceman S** 2012 Arginine methylation of RNA-binding proteins regulates cell function and differentiation. *Mol Reprod Dev* **79** 163-175.
- Blackwell E, Zhang X & Ceman S** 2010 Arginines of the RGG box regulate FMRP association with polyribosomes and mRNA. *Hum Mol Genet* **19** 1314-1323.
- Bloom W & Fawcett WD** 1997 Tratado de Histología, 11ava ed. Madrid: Mc. Graw Hill - Interamericana.
- Brackett DM, Qing F, Amieux PS, Sellers DL, Horner PJ & Morris DR** 2013 FMR1 transcript isoforms: association with polyribosomes; regional and developmental expression in mouse brain. *PLoS One* **8** e58296.
- Bradford MM** 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72** 248-254.
- Brouwer JR, Mientjes EJ, Bakker CE, Nieuwenhuizen IM, Severijnen LA, Van der Linde HC, Nelson DL, Oostra BA & Willemsen R** 2007 Elevated Fmr1 mRNA levels and reduced protein expression in a mouse model with an unmethylated Fragile X full mutation. *Exp Cell Res* **313** 244-253.
- Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, Jin X, Feng Y, Wilkinson KD, Keene JD, Darnell RB & Warren ST** 2001 Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* **107** 477-487.

- Brown V, Small K, Lakkis L, Feng Y, Gunter C, Wilkinson KD & Warren ST** 1998 Purified recombinant Fmrp exhibits selective RNA binding as an intrinsic property of the fragile X mental retardation protein. *J Biol Chem* **273** 15521-15527.
- Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP, Flavell RA, Goncalves PB, Tilly JL & Rueda BR** 2002 Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology* **143** 1495-1501.
- Carletti MZ & Christenson LK** 2009 MicroRNA in the ovary and female reproductive tract. *J Anim Sci* **87** E29-38.
- Caron MG, Goldstein S, Savard K & Marsh JM** 1975 Protein kinase stimulation of a reconstituted cholesterol side chain cleavage enzyme system in the bovine corpus luteum. *J Biol Chem* **250** 5137-5143.
- Caudy AA, Myers M, Hannon GJ & Hammond SM** 2002 Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* **16** 2491-2496.
- Ceman S, Brown V & Warren ST** 1999 Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X-related proteins as components of the complex. *Mol Cell Biol* **19** 7925-7932.
- Ceman S, Nelson R & Warren ST** 2000 Identification of mouse YB1/p50 as a component of the FMRP-associated mRNP particle. *Biochem Biophys Res Commun* **279** 904-908.
- Ceman S, O'Donnell WT, Reed M, Patton S, Pohl J & Warren ST** 2003 Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Hum Mol Genet* **12** 3295-3305.
- Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ & Greenough WT** 1997 Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** 5401-5404.
- Cordts EB, Christofolini DM, Dos Santos AA, Bianco B & Barbosa CP** 2011 Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. *Arch Gynecol Obstet* **283** 635-643.

- Costa A, Wang Y, Dockendorff TC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Schedl P & Jongens TA** 2005 The Drosophila fragile X protein functions as a negative regulator in the orb autoregulatory pathway. *Dev Cell* **8** 331-342.
- Cramer DW, Xu H & Harlow BL** 1995 Family history as a predictor of early menopause. *Fertil Steril* **64** 740-745.
- Cronister A, Teicher J, Rohlfs EM, Donnenfeld A & Hallam S** 2008 Prevalence and instability of fragile X alleles: implications for offering fragile X prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol* **111** 596-601.
- Cheever A & Ceman S** 2009 Phosphorylation of FMRP inhibits association with Dicer. *RNA* **15** 362-366.
- Chen LS, Tassone F, Sahota P & Hagerman PJ** 2003 The (CGG)<sub>n</sub> repeat element within the 5' untranslated region of the FMR1 message provides both positive and negative cis effects on in vivo translation of a downstream reporter. *Hum Mol Genet* **12** 3067-3074.
- Chen Y, Tassone F, Berman RF, Hagerman PJ, Hagerman RJ, Willemsen R & Pessah IN** 2010 Murine hippocampal neurons expressing Fmr1 gene premutations show early developmental deficits and late degeneration. *Hum Mol Genet* **19** 196-208.
- Chiauzzi, Ferder, Alba, Belli, Escobar, Charreau & Dain** 2010 Estudios de la región 5'UTR del gen FMR-1 en pacientes con Falla Ovárica Prematura. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*. **47** 3-10.
- Chiauzzi V, Cigorruga S, Escobar ME, Rivarola MA & Charreau EH** 1982 Inhibition of follicle-stimulating hormone receptor binding by circulating immunoglobulins. *J Clin Endocrinol Metab* **54** 1221-1228.
- Chiauzzi VA, Bussmann L, Calvo JC, Sundblad V & Charreau EH** 2004 Circulating immunoglobulins that inhibit the binding of follicle-stimulating hormone to its receptor: a putative diagnostic role in resistant ovary syndrome? *Clin Endocrinol (Oxf)* **61** 46-54.
- Christenson LK** 2010 MicroRNA control of ovarian function. *Anim Reprod* **7** 129-133.

- Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E & Hsueh AJ** 1996 Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* **137** 1447-1456.
- Chun SY & Hsueh AJ** 1998 Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J Reprod Immunol* **39** 63-75.
- Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST & Darnell RB** 2001 Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* **107** 489-499.
- De Baere E, Lemercier B, Christin-Maitre S, Durval D, Messiaen L, Fellous M & Veitia R** 2002 FOXL2 mutation screening in a large panel of POF patients and XX males. *J Med Genet* **39** e43.
- de Bruin JP, Bovenhuis H, van Noord PA, Pearson PL, van Arendonk JA, te Velde ER, Kuurman WW & Dorland M** 2001 The role of genetic factors in age at natural menopause. *Hum Reprod* **16** 2014-2018.
- De Rubeis S & Bagni C** 2011 Regulation of molecular pathways in the Fragile X Syndrome: insights into Autism Spectrum Disorders. *J Neurodev Disord* **3** 257-269.
- Dekel N, Galiani D & Sherizly I** 1988 Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Mol Cell Endocrinol* **56** 115-121.
- Denman RB** 2002 Methylation of the arginine-glycine-rich region in the fragile X mental retardation protein FMRP differentially affects RNA binding. *Cell Mol Biol Lett* **7** 877-883.
- Denman RB, Dolzhanskaya N & Sung YJ** 2004 Regulating a translational regulator: mechanisms cells use to control the activity of the fragile X mental retardation protein. *Cell Mol Life Sci* **61** 1714-1728.



- Denman RB & Sung YJ** 2002 Species-specific and isoform-specific RNA binding of human and mouse fragile X mental retardation proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **292** 1063-1069.
- Devoto L, Christenson LK, McAllister JM, Makrigiannakis A & Strauss JF, 3rd** 1999 Insulin and insulin-like growth factor-I and -II modulate human granulosa-lutein cell steroidogenesis: enhancement of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression. *Mol Hum Reprod* **5** 1003-1010.
- Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP & Mandel JL** 1993 The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet* **4** 335-340.
- Didiot MC, Tian Z, Schaeffer C, Subramanian M, Mandel JL & Moine H** 2008 The G-quartet containing FMRP binding site in FMR1 mRNA is a potent exonic splicing enhancer. *Nucleic Acids Res* **36** 4902-4912.
- Dolzhanskaya N, Merz G, Aletta JM & Denman RB** 2006a Methylation regulates the intracellular protein-protein and protein-RNA interactions of FMRP. *J Cell Sci* **119** 1933-1946.
- Dolzhanskaya N, Merz G & Denman RB** 2006b Alternative splicing modulates protein arginine methyltransferase-dependent methylation of fragile X syndrome mental retardation protein. *Biochemistry* **45** 10385-10393.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N & Matzuk MM** 1996 Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* **383** 531-535.
- Eberhart DE, Malter HE, Feng Y & Warren ST** 1996 The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet* **5** 1083-1091.

- Eichler EE, Richards S, Gibbs RA & Nelson DL** 1993 Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* **2** 1147-1153.
- Elmore S** 2007 Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35** 495-516.
- Elvin JA & Matzuk MM** 1998 Mouse models of ovarian failure. *Rev Reprod* **3** 183-195.
- Ennis S, Ward D & Murray A** 2006 Nonlinear association between CGG repeat number and age of menopause in FMR1 premutation carriers. *Eur J Hum Genet* **14** 253-255.
- Entezam A, Biacsi R, Orrison B, Saha T, Hoffman GE, Grabczyk E, Nussbaum RL & Usdin K** 2007 Regional FMRP deficits and large repeat expansions into the full mutation range in a new Fragile X premutation mouse model. *Gene* **395** 125-134.
- Eppig JJ** 1979 FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* **281** 483-484.
- Epstein AM, Bauer CR, Ho A, Bosco G & Zarnescu DC** 2009 Drosophila Fragile X protein controls cellular proliferation by regulating cbl levels in the ovary. *Dev Biol* **330** 83-92.
- Feng Y, Gutekunst CA, Eberhart DE, Yi H, Warren ST & Hersch SM** 1997 Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J Neurosci* **17** 1539-1547.
- Feng Y, Zhang F, Lokey LK, Chastain JL, Lakkis L, Eberhart D & Warren ST** 1995 Translational suppression by trinucleotide repeat expansion at FMR1. *Science* **268** 731-734.
- Fernandez-Carvajal I, Lopez Posadas B, Pan R, Raske C, Hagerman PJ & Tassone F** 2009 Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations. *J Mol Diagn* **11** 306-310.
- Fernandez E, Rajan N & Bagni C** 2013 The FMRP regulon: from targets to disease convergence. *Front Neurosci* **7** 191.
- Fiedler SD, Carletti MZ, Hong X & Christenson LK** 2008 Hormonal regulation of MicroRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells. *Biol Reprod* **79** 1030-1037.

- Flaws JA, Abbud R, Mann RJ, Nilson JH & Hirshfield AN** 1997 Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biol Reprod* **57** 1233-1237.
- Flaws JA, Doerr JK, Sipes IG & Hoyer PB** 1994 Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide. *Reprod Toxicol* **8** 509-514.
- Fogli A, Gauthier-Barichard F, Schiffmann R, Vanderhoof VH, Bakalov VK, Nelson LM & Boespflug-Tanguy O** 2004 Screening for known mutations in EIF2B genes in a large panel of patients with premature ovarian failure. *BMC Womens Health* **4** 8.
- Fortune JE & Armstrong DT** 1977 Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrous rat follicles. *Endocrinology* **100** 1341-1347.
- Fraser HM** 2006 Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reprod Biol Endocrinol* **4** 18.
- Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG, Jr., Warren ST & et al.** 1991 Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* **67** 1047-1058.
- Garber KB, Visootsak J & Warren ST** 2008 Fragile X syndrome. *Eur J Hum Genet* **16** 666-672.
- Garcia-Alegria E, Ibanez B, Minguez M, Poch M, Valiente A, Sanz-Parra A, Martinez-Bouzas C, Beristain E & Tejada MI** 2007 Analysis of FMR1 gene expression in female premutation carriers using robust segmented linear regression models. *RNA* **13** 756-762.
- Garcia-Arocena D & Hagerman PJ** 2010 Advances in understanding the molecular basis of FXTAS. *Hum Mol Genet* **19** R83-89.
- Geva E & Jaffe R** 2004 The ovary: Ovarian Angiogenesis. Second edition ed. San Diego, California. USA: Elsevier Academic Press; 2004: 305-317

- Gonzalez CR, Matzkin ME, Frungieri MB, Terradas C, Ponzio R, Puigdomenech E, Levalle O, Calandra RS & Gonzalez-Calvar SI** 2010 Expression of the TGF-beta1 system in human testicular pathologies. *Reprod Biol Endocrinol* **8** 148.
- Goodman AL & Hodgen GD** 1983 The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* **39** 1-73.
- Goodman SB, Kugu K, Chen SH, Preutthipan S, Tilly KI, Tilly JL & Dharmarajan AM** 1998 Estradiol-mediated suppression of apoptosis in the rabbit corpus luteum is associated with a shift in expression of bcl-2 family members favoring cellular survival. *Biol Reprod* **59** 820-827.
- Gougeon A & Busso D** 2000 Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Mol Cell Endocrinol* **163** 33-42.
- Gougeon A & Testart J** 1986 Germinal vesicle breakdown in oocytes of human atretic follicles during the menstrual cycle. *J Reprod Fertil* **78** 389-401.
- Gougeon A & Testart J** 1990 Influence of human menopausal gonadotropin on the recruitment of human ovarian follicles. *Fertil Steril* **54** 848-852.
- Greco CM, Berman RF, Martin RM, Tassone F, Schwartz PH, Chang A, Trapp BD, Iwahashi C, Brunberg J, Grigsby J, Hessel D, Becker EJ, Papazian J, Leehey MA, Hagerman RJ & Hagerman PJ** 2006 Neuropathology of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Brain* **129** 243-255.
- Hagerman R & Hagerman P** 2013 Advances in clinical and molecular understanding of the FMR1 premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Lancet Neurol* **12** 786-798.
- Hagerman RJ & Hagerman PJ** 2002 The fragile X premutation: into the phenotypic fold. *Curr Opin Genet Dev* **12** 278-283.

- Hakuno N, Koji T, Yano T, Kobayashi N, Tsutsumi O, Taketani Y & Nakane PK** 1996 Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology* **137** 1938-1948.
- Halpin DM & Charlton HM** 1988 Effects of short-term injection of gonadotrophins on ovarian follicle development in hypogonadal (hpg) mice. *J Reprod Fertil* **82** 393-400.
- Handa V, Goldwater D, Stiles D, Cam M, Poy G, Kumari D & Usdin K** 2005 Long CGG-repeat tracts are toxic to human cells: implications for carriers of Fragile X premutation alleles. *FEBS Lett* **579** 2702-2708.
- Hashem V, Galloway JN, Mori M, Willemsen R, Oostra BA, Paylor R & Nelson DL** 2009 Ectopic expression of CGG containing mRNA is neurotoxic in mammals. *Hum Mol Genet* **18** 2443-2451.
- He H, Herington AC & Roupas P** 1994 Involvement of G proteins in the effect of insulin-like growth factor I on gonadotropin-induced rat granulosa cell differentiation. *Growth Regul* **4** 20-28.
- Heape W** 1900 The "Sexual Season" of Mammals and the Relation of the " Pro-cestum " to Menstruation.
- Hessl D, Tassone F, Loesch DZ, Berry-Kravis E, Leehey MA, Gane LW, Barbato I, Rice C, Gould E, Hall DA, Grigsby J, Wegelin JA, Harris S, Lewin F, Weinberg D, Hagerman PJ & Hagerman RJ** 2005 Abnormal elevation of FMR1 mRNA is associated with psychological symptoms in individuals with the fragile X premutation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **139B** 115-121.
- Hinds HL, Ashley CT, Sutcliffe JS, Nelson DL, Warren ST, Housman DE & Schalling M** 1993 Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat Genet* **3** 36-43.
- Hinton VJ, Brown WT, Wisniewski K & Rudelli RD** 1991 Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* **41** 289-294.

- Hirshfield AN** 1991 Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* **124** 43-101.
- Hirshfield AN & Midgley AR, Jr.** 1978 Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod* **19** 597-605.
- Hoem G, Raske CR, Garcia-Arocena D, Tassone F, Sanchez E, Ludwig AL, Iwahashi CK, Kumar M, Yang JE & Hagerman PJ** 2011 CGG-repeat length threshold for FMR1 RNA pathogenesis in a cellular model for FXTAS. *Hum Mol Genet* **20** 2161-2170.
- Hoffman GE, Le WW, Entezam A, Otsuka N, Tong ZB, Nelson L, Flaws JA, McDonald JH, Jafar S & Usdin K** 2012 Ovarian Abnormalities in a Mouse Model of Fragile X Primary Ovarian Insufficiency. *J Histochem Cytochem.*
- Hu CL, Cowan RG, Harman RM & Quirk SM** 2004 Cell cycle progression and activation of Akt kinase are required for insulin-like growth factor I-mediated suppression of apoptosis in granulosa cells. *Mol Endocrinol* **18** 326-338.
- Hundscheid RD, Smits AP, Thomas CM, Kiemeney LA & Braat DD** 2003 Female carriers of fragile X premutations have no increased risk for additional diseases other than premature ovarian failure. *Am J Med Genet A* **117A** 6-9.
- Hunsaker MR, Greco CM, Spath MA, Smits AP, Navarro CS, Tassone F, Kros JM, Severijnen LA, Berry-Kravis EM, Berman RF, Hagerman PJ, Willemsen R, Hagerman RJ & Hukema RK** 2011 Widespread non-central nervous system organ pathology in fragile X premutation carriers with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome and CGG knock-in mice. *Acta Neuropathol* **122** 467-479.
- Hvid H, Ekstrom CT, Vienberg S, Oleksiewicz MB & Klopffleisch R** 2011 Identification of stable and oestrus cycle-independent housekeeping genes in the rat mammary gland and other tissues. *Vet J* **190** 103-108.
- Ikeguchi M, Hirooka Y & Kaibara N** 2002 Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **95** 1938-1945.

- Irusta G, Abramovich D, Parborell F & Tesone M** 2010 Direct survival role of vascular endothelial growth factor (VEGF) on rat ovarian follicular cells. *Mol Cell Endocrinol* **325** 93-100.
- Irusta G, Maidana CP, Abramovich D, De Zuniga I, Parborell F & Tesone M** 2013 Effects of an inhibitor of the gamma-secretase complex on proliferation and apoptotic parameters in a FOXL2-mutated granulosa tumor cell line (KGN). *Biol Reprod* **89** 9.
- Irving-Rodgers HF & Rodgers RJ** 2000 Ultrastructure of the basal lamina of bovine ovarian follicles and its relationship to the membrana granulosa. *J Reprod Fertil* **118** 221-228.
- Irwin SA, Patel B, Idupulapati M, Harris JB, Crisostomo RA, Larsen BP, Kooy F, Willems PJ, Cras P, Kozlowski PB, Swain RA, Weiler IJ & Greenough WT** 2001 Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. *Am J Med Genet* **98** 161-167.
- Ishizuka A, Siomi MC & Siomi H** 2002 A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev* **16** 2497-2508.
- Jin P & Warren ST** 2000 Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* **9** 901-908.
- Jin P, Zarnescu DC, Ceman S, Nakamoto M, Mowrey J, Jongens TA, Nelson DL, Moses K & Warren ST** 2004 Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat Neurosci* **7** 113-117.
- Karakji EG & Tsang BK** 1995 Follicular stage-dependent regulation of rat granulosa cell plasminogen activator system by transforming growth factor-alpha in vitro. *Biol Reprod* **52** 411-418.
- Kenneson A, Zhang F, Hagedorn CH & Warren ST** 2001 Reduced FMRP and increased FMR1 transcription is proportionally associated with CGG repeat number in intermediate-length and premutation carriers. *Hum Mol Genet* **10** 1449-1454.

- Kezele P, Nilsson EE & Skinner MK** 2005 Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biol Reprod* **73** 967-973.
- Khandjian EW, Bardoni B, Corbin F, Sittler A, Giroux S, Heitz D, Tremblay S, Pinset C, Montarras D, Rousseau F & et al.** 1998 Novel isoforms of the fragile X related protein FXR1P are expressed during myogenesis. *Hum Mol Genet* **7** 2121-2128.
- Knobil E & Neill J** 1994 Physiology of Reproduction Second edition ed.
- Kok HS, van Asselt KM, van der Schouw YT, Peeters PH & Wijmenga C** 2005 Genetic studies to identify genes underlying menopausal age. *Hum Reprod Update* **11** 483-493.
- Kondo H, Maruo T, Peng X & Mochizuki M** 1996 Immunological evidence for the expression of the Fas antigen in the infant and adult human ovary during follicular regression and atresia. *J Clin Endocrinol Metab* **81** 2702-2710.
- Kornblihtt AR, Schor IE, Allo M, Dujardin G, Petrillo E & Munoz MJ** 2013 Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14** 153-165.
- Kumar TR, Wang Y, Lu N & Matzuk MM** 1997 Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* **15** 201-204.
- Kumari D, Gabrielian A, Wheeler D & Usdin K** 2005 The roles of Sp1, Sp3, USF1/USF2 and NRF-1 in the regulation and three-dimensional structure of the Fragile X mental retardation gene promoter. *Biochem J* **386** 297-303.
- Kuroda H, Terada N, Nakayama H, Matsumoto K & Kitamura Y** 1988 Infertility due to growth arrest of ovarian follicles in Sl/Slt mice. *Dev Biol* **126** 71-79.
- Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A & Fischer U** 2001 Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet* **10** 329-338.



- Lanni S, Goracci M, Borrelli L, Mancano G, Chiurazzi P, Moscato U, Ferre F, Helmer-Citterich M, Tabolacci E & Neri G** 2013 Role of CTCF protein in regulating FMR1 locus transcription. *PLoS Genet* **9** e1003601.
- Leslie ND** 2003 Insights into the pathogenesis of galactosemia. *Annu Rev Nutr* **23** 59-80.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV & Ferrara N** 1989 Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246** 1306-1309.
- Li J, Kim JM, Liston P, Li M, Miyazaki T, Mackenzie AE, Korneluk RG & Tsang BK** 1998 Expression of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in rat granulosa cells during ovarian follicular development and atresia. *Endocrinology* **139** 1321-1328.
- Li R & Albertini DF** 2013 The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14** 141-152.
- Li Y & Jin P** 2012 RNA-mediated neurodegeneration in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Brain Res* **1462** 112-117.
- Lim JH, Booker AB & Fallon JR** 2005 Regulating fragile X gene transcription in the brain and beyond. *J Cell Physiol* **205** 170-175.
- Lokanga RA, Entezam A, Kumari D, Yudkin D, Qin M, Smith CB & Usdin K** 2013 Somatic expansion in mouse and human carriers of fragile X premutation alleles. *Hum Mutat* **34** 157-166.
- Lourenco D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, Boudjenah R, Guerra-Junior G, Maciel-Guerra AT, Achermann JC, McElreavey K & Bashamboo A** 2009 Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med* **360** 1200-1210.
- Lu C, Lin L, Tan H, Wu H, Sherman SL, Gao F, Jin P & Chen D** 2012 Fragile X premutation RNA is sufficient to cause primary ovarian insufficiency in mice. *Hum Mol Genet* **21** 5039-5047.

- Luborsky JL, Meyer P, Sowers MF, Gold EB & Santoro N** 2003 Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Hum Reprod* **18** 199-206.
- Maclaran K & Panay N** 2011 Premature ovarian failure. *J Fam Plann Reprod Health Care* **37** 35-42.
- Maekawa A** 1990 Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. Tumours of the ovary. *IARC Sci Publ* 473-497.
- Matsuda-Minehata F, Inoue N, Goto Y & Manabe N** 2006 The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti-apoptotic molecules. *J Reprod Dev* **52** 695-705.
- Matsuda F, Inoue N, Goto Y, Maeda A, Cheng Y, Sakamaki K & Manabe N** 2008 cFLIP regulates death receptor-mediated apoptosis in an ovarian granulosa cell line by inhibiting procaspase-8 cleavage. *J Reprod Dev* **54** 314-320.
- Matsuda F, Inoue N, Maeda A, Cheng Y, Sai T, Gonda H, Goto Y, Sakamaki K & Manabe N** 2011 Expression and function of apoptosis initiator FOXO3 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries. *J Reprod Dev* **57** 151-158.
- Matsuda F, Inoue N, Manabe N & Ohkura S** 2012 Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev* **58** 44-50.
- Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME & Ojeda SR** 1997 A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* **138** 3320-3329.
- Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Filion C, Labelle Y & Khandjian EW** 2002 Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum Mol Genet* **11** 3007-3017.
- McGee EA & Hsueh AJ** 2000 Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* **21** 200-214.
- Megosh HB, Cox DN, Campbell C & Lin H** 2006 The role of PIWI and the miRNA machinery in *Drosophila* germline determination. *Curr Biol* **16** 1884-1894.

- Monget P, Bobe J, Gougeon A, Fabre S, Monniaux D & Dalbès-Tran R** 2012 The ovarian reserve in mammals: a functional and evolutionary perspective. *Mol Cell Endocrinol* **356** 2-12.
- Morita Y & Tilly JL** 1999 Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol* **213** 1-17.
- Murray A, Ennis S, MacSwiney F, Webb J & Morton NE** 2000 Reproductive and menstrual history of females with fragile X expansions. *Eur J Hum Genet* **8** 247-252.
- Nelson L** 2009 Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med* **360** 606-614.
- Nelson LM, Anasti JN, Kimzey LM, Defensor RA, Lipetz KJ, White BJ, Shawker TH & Merino MJ** 1994 Development of luteinized graafian follicles in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* **79** 1470-1475.
- Nimchinsky EA, Oberlander AM & Svoboda K** 2001 Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J Neurosci* **21** 5139-5146.
- Nishi Y, Yanase T, Mu Y, Oba K, Ichino I, Saito M, Nomura M, Mukasa C, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Kashimura Y, Haji M & Nawata H** 2001 Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology* **142** 437-445.
- Nolin SL, Sah S, Glicksman A, Sherman SL, Allen E, Berry-Kravis E, Tassone F, Yrigollen C, Cronister A, Jodah M, Ersalesi N, Dobkin C, Brown WT, Shroff R, Latham GJ & Hadd AG** 2013 Fragile X AGG analysis provides new risk predictions for 45-69 repeat alleles. *Am J Med Genet A* **161** 771-778.
- O'Donnell WT & Warren ST** 2002 A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annu Rev Neurosci* **25** 315-338.
- Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas M & Mandel J** 1991 Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* **252** 1097-1102.

- Ofer N, Weisman-Shomer P, Shklover J & Fry M** 2009 The quadruplex r(CGG)<sub>n</sub> destabilizing cationic porphyrin TMPyP4 cooperates with hnRNPs to increase the translation efficiency of fragile X premutation mRNA. *Nucleic Acids Res* **37** 2712-2722.
- Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, Craig J, Wang Y, Kotsuji F & Tsang BK** 2006 Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol Endocrinol* **20** 2456-2468.
- Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B & Bao JK** 2012 Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* **45** 487-498.
- Oxberry BA & Greenwald GS** 1982 An autoradiographic study of the binding of <sup>125</sup>I-labeled follicle-stimulating hormone, human chorionic gonadotropin and prolactin to the hamster ovary throughout the estrous cycle. *Biol Reprod* **27** 505-516.
- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ & Blencowe BJ** 2008 Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* **40** 1413-1415.
- Parborell F, Pecci A, Gonzalez O, Vitale A & Tesone M** 2002 Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: regulation by epidermal growth factor and the expression of Bcl-2-related genes. *Biol Reprod* **67** 481-486.
- Pfaffl MW** 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29** e45.
- Phillips DM & Dekel N** 1982 Effect of gonadotropins and prostaglandin on cumulus mucification in cultures of intact follicles. *J Exp Zool* **221** 275-282.
- Pretto DI, Hunsaker MR, Cunningham CL, Greco CM, Hagerman RJ, Noctor SC, Hall DA, Hagerman PJ & Tassone F** 2013 Intranuclear inclusions in a fragile X mosaic male. *Transl Neurodegener* **2** 10.

- Primerano B, Tassone F, Hagerman RJ, Hagerman P, Amaldi F & Bagni C** 2002 Reduced FMR1 mRNA translation efficiency in fragile X patients with premutations. *RNA* **8** 1482-1488.
- Qin Y, Choi Y, Zhao H, Simpson JL, Chen ZJ & Rajkovic A** 2007 NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* **81** 576-581.
- Rani CS, Nordenstrom K, Norjavaara E & Ahren K** 1983 Development of catecholamine responsiveness in granulosa cells from preovulatory rat follicles--dependence on preovulatory luteinizing hormone surge. *Biol Reprod* **28** 1021-1031.
- Rebar RW & Connolly HV** 1990 Clinical features of young women with hypergonadotropic amenorrhea. *Fertil Steril* **53** 804-810.
- Reyniers E, Vits L, De Boulle K, Van Roy B, Van Velzen D, de Graaff E, Verkerk AJ, Jorens HZ, Darby JK, Oostra B & et al.** 1993 The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nat Genet* **4** 143-146.
- Rife M, Nadal A, Mila M & Willemsen R** 2004 Immunohistochemical FMRP studies in a full mutated female fetus. *Am J Med Genet A* **124A** 129-132.
- Ronesi JA & Huber KM** 2008 Metabotropic glutamate receptors and fragile x mental retardation protein: partners in translational regulation at the synapse. *Sci Signal* **1** pe6.
- Rousseau F, Rouillard P, Morel ML, Khandjian EW & Morgan K** 1995 Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMRI gene--and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* **57** 1006-1018.
- Saatli B, Kizildag S, Posaci C, Dogan E, Koyuncuoglu M, Ulukus EC & Atabey N** 2009 Long-term effects of GnRH agonist, GnRH antagonist, and estrogen plus progesterone treatment on apoptosis related genes in rat ovary. *Fertil Steril* **91** 2006-2011.
- Sai T, Matsuda F, Goto Y, Maeda A, Sugimoto M, Gao HM, Kabir AK, Li JY & Manabe N** 2012 Effect of RNA interference of BID and BAX mRNAs on apoptosis in granulosa cell-derived KGN cells. *J Reprod Dev* **58** 112-116.

- Sakamaki K, Yoshida H, Nishimura Y, Nishikawa S, Manabe N & Yonehara S** 1997 Involvement of Fas antigen in ovarian follicular atresia and luteolysis. *Mol Reprod Dev* **47** 11-18.
- Santoro MR, Bray SM & Warren ST** 2012 Molecular mechanisms of fragile X syndrome: a twenty-year perspective. *Annu Rev Pathol* **7** 219-245.
- Schaeffer C, Bardoni B, Mandel JL, Ehresmann B, Ehresmann C & Moine H** 2001 The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *EMBO J* **20** 4803-4813.
- Schuettler J, Peng Z, Zimmer J, Sinn P, von Hagens C, Strowitzki T & Vogt PH** 2011 Variable expression of the Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1) gene in patients with premature ovarian failure syndrome is not dependent on number of (CGG)<sub>n</sub> triplets in exon 1. *Hum Reprod* **26** 1241-1251.
- Sellier C, Rau F, Liu Y, Tassone F, Hukema RK, Gattoni R, Schneider A, Richard S, Willemsen R, Elliott DJ, Hagerman PJ & Charlet-Berguerand N** 2010 Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients. *EMBO J* **29** 1248-1261.
- Sherman SL** 2000a Premature ovarian failure among fragile X premutation carriers: parent-of-origin effect? *Am J Hum Genet* **67** 11-13.
- Sherman SL** 2000b Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* **97** 189-194.
- Simone DA, Chorich LP & Mahesh VB** 1993 Mechanisms of action for an androgen-mediated autoregulatory process in rat thecal-interstitial cells. *Biol Reprod* **49** 1190-1201.
- Siomi MC, Higashijima K, Ishizuka A & Siomi H** 2002 Casein kinase II phosphorylates the fragile X mental retardation protein and modulates its biological properties. *Mol Cell Biol* **22** 8438-8447.

- Sittler A, Devys D, Weber C & Mandel JL** 1996 Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms. *Hum Mol Genet* **5** 95-102.
- Skillern A & Rajkovic A** 2008 Recent developments in identifying genetic determinants of premature ovarian failure. *Sex Dev* **2** 228-243.
- Smith KT, Nicholls RD & Reines D** 2006 The gene encoding the fragile X RNA-binding protein is controlled by nuclear respiratory factor 2 and the CREB family of transcription factors. *Nucleic Acids Res* **34** 1205-1215.
- Srivastava AK & Schlessinger D** 1991 Structure and organization of ribosomal DNA. *Biochimie* **73** 631-638.
- Staley K & Scharfman H** 2005 A woman's prerogative. *Nat Neurosci* **8** 697-699.
- Stetler A, Winograd C, Sayegh J, Cheever A, Patton E, Zhang X, Clarke S & Ceman S** 2006 Identification and characterization of the methyl arginines in the fragile X mental retardation protein Fmrp. *Hum Mol Genet* **15** 87-96.
- Stocco C, Telleria C & Gibori G** 2007 The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev* **28** 117-149.
- Sullivan AK, Marcus M, Epstein MP, Allen EG, Anido AE, Paquin JJ, Yadav-Shah M & Sherman SL** 2005 Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Hum Reprod* **20** 402-412.
- Sullivan SD & Castrillon DH** 2011 Insights into primary ovarian insufficiency through genetically engineered mouse models. *Semin Reprod Med* **29** 283-298.
- Sullivan SD, Welt C & Sherman S** 2011 FMR1 and the continuum of primary ovarian insufficiency. *Semin Reprod Med* **29** 299-307.
- Sundblad V, Bussmann L, Chiauzzi VA, Pancholi V & Charreau EH** 2006a Alpha-enolase: a novel autoantigen in patients with premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf)* **65** 745-751.

- Sundblad V, Chiauzzi V, Andreone L, Campo L, Charreau E & Dain L** 2010 Role of polymorphisms 919A>G and 2039A>G of FSH receptor (FSHR) gene in premature ovarian failure (POF) development. *Current Trends in Endocrinology* **4**.
- Sundblad V, Chiauzzi VA, Andreone L, Campo S, Charreau EH & Dain L** 2006b Controversial role of inhibin alpha-subunit gene in the aetiology of premature ovarian failure. *Hum Reprod* **21** 1154-1160.
- Sundblad V, Chiauzzi VA, Escobar ME, Dain L & Charreau EH** 2004 Screening of FSH receptor gene in Argentine women with premature ovarian failure (POF). *Mol Cell Endocrinol* **222** 53-59.
- Tamanini F, Meijer N, Verheij C, Willems PJ, Galjaard H, Oostra BA & Hoogeveen AT** 1996 FMRP is associated to the ribosomes via RNA. *Hum Mol Genet* **5** 809-813.
- Tamanini F, Willemsen R, van Unen L, Bontekoe C, Galjaard H, Oostra BA & Hoogeveen AT** 1997 Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 proteins in human brain and testis. *Hum Mol Genet* **6** 1315-1322.
- Tassone F, Beilina A, Carosi C, Albertosi S, Bagni C, Li L, Glover K, Bentley D & Hagerman PJ** 2007 Elevated FMR1 mRNA in premutation carriers is due to increased transcription. *RNA* **13** 555-562.
- Tassone F, De Rubeis S, Carosi C, La Fata G, Serpa G, Raske C, Willemsen R, Hagerman PJ & Bagni C** 2011 Differential usage of transcriptional start sites and polyadenylation sites in FMR1 premutation alleles. *Nucleic Acids Res* **39** 6172-6185.
- Tassone F, Hagerman RJ, Garcia-Arocena D, Khandjian EW, Greco CM & Hagerman PJ** 2004a Intranuclear inclusions in neural cells with premutation alleles in fragile X associated tremor/ataxia syndrome. *J Med Genet* **41** e43.
- Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE & Hagerman PJ** 2000 Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet* **66** 6-15.



- Tassone F, Iwahashi C & Hagerman PJ** 2004b FMR1 RNA within the intranuclear inclusions of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *RNA Biol* **1** 103-105.
- Tejada MI, Garcia-Alegria E, Bilbao A, Martinez-Bouzas C, Beristain E, Poch M, Ramos-Arroyo MA, Lopez B, Fernandez Carvajal I, Ribate MP & Ramos F** 2008 Analysis of the molecular parameters that could predict the risk of manifesting premature ovarian failure in female premutation carriers of fragile X syndrome. *Menopause* **15** 945-949.
- Terracciano A, Pomponi MG, Marino GM, Chiurazzi P, Rinaldi MM, Dobosz M & Neri G** 2004 Expansion to full mutation of a FMR1 intermediate allele over two generations. *Eur J Hum Genet* **12** 333-336.
- Tesone, Abramovich, Irusta & Parborell** 2009 In Reproductive Endocrinology: A Molecular Approach. Autocrine and Paracrine Regulation of the Ovary. Chedrese, PJ eds. Springer pp 241-248
- Thibault C, Levasseur M & Hunter R** 1993 Reproduction in Mammals and Man. English revised edition ed. .
- Thomas FH & Vanderhyden BC** 2006 Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol* **4** 19.
- Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML & Johnson AL** 1995 Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* **136** 232-241.
- Todd PK, Malter JS & Mack KJ** 2003 Whisker stimulation-dependent translation of FMRP in the barrel cortex requires activation of type I metabotropic glutamate receptors. *Brain Res Mol Brain Res* **110** 267-278.
- Urban RJ, Garmey JC, Shupnik MA & Veldhuis JD** 1990 Insulin-like growth factor type I increases concentrations of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450

- cholesterol side-chain cleavage enzyme in primary cultures of porcine granulosa cells. *Endocrinology* **127** 2481-2488.
- van Kasteren YM, Hundscheid RD, Smits AP, Cremers FP, van Zonneveld P & Braat DD** 1999 Familial idiopathic premature ovarian failure: an overrated and underestimated genetic disease? *Hum Reprod* **14** 2455-2459.
- van Kasteren YM & Schoemaker J** 1999 Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. *Hum Reprod Update* **5** 483-492.
- Vegetti W, Grazia Tibiletti M, Testa G, de Lauretis Y, Alagna F, Castoldi E, Taborelli M, Motta T, Bolis PF, Dalpra L & Crosignani PG** 1998 Inheritance in idiopathic premature ovarian failure: analysis of 71 cases. *Hum Reprod* **13** 1796-1800.
- Velasquez EV, Rios M, Ortiz ME, Lizama C, Nunez E, Abramovich D, Orge F, Oliva B, Orellana R, Villalon M, Moreno RD, Tesone M, Rokka A, Corthals G, Croxatto HB, Parborell F & Owen GI** 2013 Concanavalin-A induces granulosa cell death and inhibits FSH-mediated follicular growth and ovarian maturation in female rats. *Endocrinology* **154** 1885-1896.
- Verkerk AJ, de Graaff E, De Boule K, Eichler EE, Konecki DS, Reyniers E, Manca A, Poustka A, Willems PJ, Nelson DL & et al.** 1993 Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Hum Mol Genet* **2** 399-404.
- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP & et al.** 1991 Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* **65** 905-914.
- Vitt UA, Kloosterboer HJ, Rose UM, Mulders JW, Kiesel PS, Bete S & Nayudu PL** 1998 Isoforms of human recombinant follicle-stimulating hormone: comparison of effects on murine follicle development in vitro. *Biol Reprod* **59** 854-861.

- Welt CK, Smith PC & Taylor AE** 2004 Evidence of early ovarian aging in fragile X premutation carriers. *J Clin Endocrinol Metab* **89** 4569-4574.
- Willemsen R, Levenga J & Oostra BA** 2011 CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. *Clin Genet* **80** 214-225.
- Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, McConkie-Rosell A, Welt CK, Rebar RW, Corrigan EC, Simpson JL & Nelson LM** 2007 The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil Steril* **87** 456-465.
- Woods DC, Alvarez C & Johnson AL** 2008a Cisplatin-mediated sensitivity to TRAIL-induced cell death in human granulosa tumor cells. *Gynecol Oncol* **108** 632-640.
- Woods DC, Liu HK, Nishi Y, Yanase T & Johnson AL** 2008b Inhibition of proteasome activity sensitizes human granulosa tumor cells to TRAIL-induced cell death. *Cancer Lett* **260** 20-27.
- Woods DC, White YA & Tilly JL** 2013 Purification of oogonial stem cells from adult mouse and human ovaries: an assessment of the literature and a view toward the future. *Reprod Sci* **20** 7-15.
- Xie W, Dolzhanskaya N, LaFauci G, Dobkin C & Denman RB** 2009 Tissue and developmental regulation of fragile X mental retardation 1 exon 12 and 15 isoforms. *Neurobiol Dis* **35** 52-62.
- Yang L, Duan R, Chen D, Wang J & Jin P** 2007 Fragile X mental retardation protein modulates the fate of germline stem cells in Drosophila. *Hum Mol Genet* **16** 1814-1820.
- Yen S, Jaffe R & Barbieri R** 2001 Endocrinología de la Reproducción, 4ta ed.
- Zalfa F & Bagni C** 2004 Molecular insights into mental retardation: multiple functions for the Fragile X mental retardation protein? *Curr Issues Mol Biol* **6** 73-88.
- Zhang CP, Yang JL, Zhang J, Li L, Huang L, Ji SY, Hu ZY, Gao F & Liu YX** 2011 Notch signaling is involved in ovarian follicle development by regulating granulosa cell proliferation. *Endocrinology* **152** 2437-2447.



# APÉNDICE

Soluciones y buffers

**Buffer de siembra (3X) para Western blot:** Tris-HCl 60 mM, pH: 6,8, dodecilsulfato sódico (SDS) 2% p/v, Glicerol 10% v/v,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,7 M, Azul de bromofenol 0,1% p/v.

**Buffer de transferencia para Western blot:** Tris 0,3% p/v, Glicina 1,44% p/v, Metanol 20%.

**Buffer de corrida para Western blot:** Tris 0,3% p/v, Glicina 1,44% p/v, SDS 0,1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,024 % p/v, pH 7,2.

**Buffer fosfato salino (PBS):** NaCl 0,8 % p/v, KCl 0,02 % p/v,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1437 % p/v.

**Medio LB agar:** 5 gr de extracto de levadura, 10 gr peptona, 10 gr NaCl, 12 gr agar. Disolver 37 gr en 1000 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

**Medio LB:** 5 gr de extracto de levadura, 10 gr peptona, 10 gr NaCl. Disolver 25 gr en 1000 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

**Buffer RIA:** 40 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 39,5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 155 mM NaCl, 0,1% azida sódica, 1% gelatina, pH 7,0.

**Hematoxilina:** hematoxilina certificada, 2 g/l, yodato sódico, 0,2 g/l, sulfato de aluminio, 17,6 g/l, estabilizantes.

**Buffer de lisis para folículos y ovarios:** 20 mM Tris- HCl pH 8, 137 mM NaCl, 1% NP-40, 10% glicerol.

**Inhibidores de proteasas:** 104 mM AEBSF, 80  $\mu\text{M}$  aprotinina, 4 mM bestatina, 1,4 mM E-64, 2 mM leupeptina, 1,5 mM pepstaina A, Sigma.

**Buffer urea:** 1% Triton-X, 100 mM Tris-HCl, pH 6,8, 6 M Urea.

**Buffer lisis para músculo:** 50 mM Tris- HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1% NP-40, 0,1% SDS, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ .

**Buffer lisis para cerebro:** 40 mM Tris- HCl, 120 mM NaCl, 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1% Triton- X 100, 1 mM PMSF.

**Buffer DNasa:** 200 mM Tris- HCl pH 8,4, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500 mM KCl.

**Buffer de PCR:** 200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl.

**Buffer de siembra 6X:** Azul de bromofenol 0,25%; Xylene cyanol 0,25%, glicerol 30%.

**Buffer TBE:** Tris base 8,9 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM.

**Solución TfbI:** 30 mM Acetato de potasio, 100 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15% glicerol.

**Solución TfbII:** 10 mM Pipes o Mops, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 15% glicerol.

**Solución I para purificación de plásmidos:** 50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, pH 8.

**Solución II para purificación de plásmidos:** 0,2 N NaOH, 1% SDS.

**Solución III para purificación de plásmidos:** 60 ml acetato de potasio, 11,5 ml de ácido acético glacial, 28,5 ml de H<sub>2</sub>O.

**Pseudogen de *HPRT Rattus norvegicus* (R. norvegicus mRNA for hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase pseudogene)**

```

1  ccatttgaaa ggcggaatca tacctcactg ctttcccaag cagcacctcc tccgccaggc
61  ttctctctca gattgctttt cttgcgagcc gaccggttct gtcattgtcga ccctcagtcc
121 cagcgtcatg attagtgatg atgaaccagg ttatgacctg gatttatattt gcatacctaa
181 tcattatgcc tgaagaattt ggaaaagggtg tttattcctc atggactgat tatggacagg
241 actgaaagac ttgctcgaga tgtcatgaag aagatgggag gccatcacat tgtggccctc
301 tgtgtgttca aggggggcta taaattcttt gatggattac attaaagcac cgaatagaaa
361 tagttatagg tccattccta tgactgtaga ttttatcaga ctgaagagct actgtaatga
421 ccagtcaacg ggggaacata aaagttattg gtggagatga tc

```

**Secuencia del pseudogen de *HPRT* de rata.** Se muestra resaltada la secuencia en la que se aparearía el cebador sentido (GCTGAAGATTTGGAAAAGGTG) aunque la primera base es diferente. El cebador antisentido (AATCCAGCAGGTCAGCAAAG) no se aparearía con esta secuencia.